



Valorización de la cascarilla de cebada del proceso cervecero para la producción de xilitol

Lilia Carolina Rojas Pérez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental
Bogotá, Colombia
2018

Valorización de la cascarilla de cebada del proceso cervecero para la producción de xilitol

Lilia Carolina Rojas Pérez

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Doctor en Ingeniería- Ingeniería Química

Directora:

D. Ing., Balkys Esmeralda Quevedo Hidalgo

Codirector:

D. Ing., Paulo César Narváez Rincón

Línea de Investigación:

Biomasa y biocombustibles

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Procesos Químicos y Bioquímicos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental

Bogotá, D.C., Colombia

2018

A Eduardo, vida mía: por las pequeñas cosas... el sol contigo, la lluvia abrazados, la tristeza juntos, el deseo compartido, la alegría celebrada, la distancia soportada, por esas pequeñas cosas que nos unen; eres lo más importante para mí.

Agradecimientos

A mi esposo Eduardo por su amor, paciencia, consejos, constante disposición y apoyo incondicional. Simplemente gracias por estar siempre conmigo.

A mis padres y hermanos, especialmente a mi mamá quien siempre me ha impulsado a continuar en este proceso de formación y me ha apoyado constantemente para lograr mis metas; gracias por enseñarme a ser una persona independiente y a nunca dejar de soñar.

A los profesores Paulo César Narváez Rincón y Balkys Esmeralda Quevedo Hidalgo por el acompañamiento que me proporcionaron durante el desarrollo de esta tesis doctoral.

Quiero dar el agradecimiento más especial a Ignacio Ballesteros Perdices, por su apoyo constante e inagotable paciencia, por todo el tiempo que dedicó a escuchar mis preguntas e ideas, por sus pacientes explicaciones, por ayudarme con los ensayos experimentales. Gracias por las grandes discusiones que compartimos donde siempre valoraste mi opinión, gracias por la inmensa generosidad y humildad con la que transmites tus conocimientos y amplia experiencia en este tema, gracias por ser mi director de corazón y por enseñarme todo lo que sé de materiales lignocelulósicos.

A la profesora Coralia Osorio por su constante apoyo, consejos académicos y personales, y por adoptarme y brindarme un espacio no solamente físico sino personal en su Grupo de Aditivos Naturales de Aroma y Color, así mismo gracias a Danilo, Alicia, Jhoanita y Juli, personas que conocí en este grupo y que me brindaron su apoyo.

Al profesor Juan Carlos Serrato por su constante apoyo, consejos académicos y personales, ayuda con el HPLC y por todo el tiempo que me brindó para escuchar mis problemas y así mismo ayudarme a encontrar la mejor solución para afrontarlos.

A Richy de los laboratorios de Ingeniería Química, gracias por su constante amabilidad y disposición siempre para ayudarme.

A la profesora Nhora Martínez, por su valiosa ayuda en la parte estadística (formulación y análisis) aplicada en la experimentación de esta tesis, gracias por la paciencia y por sus observaciones acertadas, gracias por compartir con amabilidad y generosidad su amplio conocimiento del tema.

Al profesor Manuel Antonio Coimbra de la Universidad de Aveiro por darme la oportunidad de realizar una estancia corta en su grupo de investigación ResPoStA, a Elisabete Coelho por orientarme desde el primer día que llegué a Portugal, por su paciencia y por siempre estar pendiente de mí. Gracias a los dos por la orientación académica en la

compresión de la estructura química de los arabinoxilanos. Así mismo quiero dar mis más sinceros agradecimientos a Catia Martins, Angelica Rocha, Sonia Ferreira, Sonia Pereira, Andrea Ferreira, Guido Lopes, Angelo Salvador, Zelia Alves, Lara Antonio, Ana Catarina, Magda Santos, Soraia Silva, Anabela Silva, Ana Moreira, Pedro Fernandes e Ivonne Delgadillo porque cada uno de ustedes con su ayuda, amistad y apoyo hicieron de mi estancia en la Universidad de Aveiro, una experiencia muy enriquecedora.

A todas las personas con las que tuve la oportunidad de compartir en el Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas CIEMAT: María José, Feli, David M., José Miguel, Paloma, Mercedes, José Luis, Aleta, Alberto, Isabel, Cristina, Arantxa, Miguel ATI, Javier, Miguel, Altagracia, Naim y David G. Muchas gracias por todo el apoyo que me brindaron, por compartir sus conocimientos y experiencias en el tema de materiales lignocelulósicos conmigo. Gracias porque cada uno de ustedes aportó de una u otra forma al desarrollo de este proyecto.

A la señora Marta un agradecimiento muy especial por haber hecho de mi estancia en Madrid una experiencia muy enriquecedora, gracias por haberme hecho sentir como en casa.

A Caroll y Luisa de los Laboratorios de Nutrición Animal, por su amabilidad y ayuda.

A los amigos que me deja esta experiencia: Fabián Rico, Hernán Yanguatin, Daniel Méndez y Laura Muñoz gracias por sus palabras de aliento, por su apoyo constante y por su buen humor. A María Fernanda Gutiérrez gracias por su compañerismo y ayuda.

A mis amigos Alejandro Bourdon, Felipe Mendoza, William Cortes, Luisa Gómez, Liliana Becerra, Ligia Rodríguez y la profesora Cecilia Bacca, gracias por su apoyo, aclaración de dudas y palabras de aliento.

A Sebastián Arocha, Andrés Gil, Leonardo Suarez y Daniela González por participar con entusiasmo en este proyecto.

A Colciencias por su financiación mediante la convocatoria 617 Apoyos a doctorados nacionales y la DIB Dirección de investigaciones de la sede Bogotá, por el financiamiento a través del proyecto: “Estudio de pre-factibilidad técnico-económica de una biorrefinería para la producción de xilitol en Colombia a partir de la cascarilla de cebada co-producto del proceso cervecero”

Y a todos aquellos que de una u otra manera contribuyeron para el feliz término de este proyecto.

Resumen

En el contexto de la bioeconomía, las biorrefinerías fase III tienen como objetivo la obtención de diversos productos de mayor valor agregado que los biocombustibles, a partir de diferentes tipos de biomásas, principalmente agroindustriales. Esta tendencia es cada vez más importante y se espera que en el corto plazo sea una realidad. En esta investigación se produjo xilitol a partir de la cascarilla de cebada residual del proceso cervecero, una de las biomásas agroindustriales más generadas a nivel global y local, a través de dos opciones de proceso diferentes que involucraron un pre-tratamiento alcalino o de explosión con vapor, seguidas de la hidrólisis enzimática de los arabinoxilanos extraídos en el medio líquido y la posterior fermentación de la xilosa liberada hasta xilitol.

En la primera opción de proceso desarrollada, se realizó por primera vez un estudio cinético de la extracción de los arabinoxilanos en el líquido de pre-tratamiento alcalino, encontrándose el mayor grado de extracción a las 12 horas de reacción con un rendimiento del 64,81%, a 40°C, 360 rpm y una relación de alimentación de 1:14 peso de cascarilla por volumen de NaOH 4 M. El seguimiento de la reacción a través del tiempo, permitió el ajuste de una cinética de primer orden pseudo-homogénea irreversible según el modelo de Saeman, así como la determinación de la energía de activación para tres de las cuatro temperaturas evaluadas (ecuación de Arrhenius). Para la segunda opción de proceso se evaluó por primera vez una etapa enzimática integrada de desproteización y eliminación de almidón previa al pre-tratamiento de explosión con vapor; el rendimiento máximo que se alcanzó fue de 47,0%, realizando la operación a 173,5°C por 15,5 min (condiciones optimizadas) e impregnando la biomasa con 0,5% p/v H₂SO₄.

Posteriormente, se realizó la hidrólisis enzimática de los arabinoxilanos extraídos en los líquidos de pre-tratamiento de dos maneras diferentes: evaluando la sinergia de hasta siete enzimas puras tipo endo-1,4- β -xilanasas de las familias GH10 y GH11, α -L-arabinofuranosidasas de la familia GH51 y GH43, β -xilosidasas, α -D-glucuronidasas, acetil xilano y feruloil estearasas, o el complejo enzimático comercial CellicTM Ctec I

suplementado con β -xilosidasa. El máximo rendimiento que se obtuvo para la liberación de xilosa fue de 63,63% para el primer pre-tratamiento y de 78-86% para el segundo pre-tratamiento, destacándose que por primera vez se realizó una hidrólisis enzimática de un líquido de pre-tratamiento proveniente de la tecnología de explosión con vapor, con una concentración potencial de sustrato de 60 g/L de xilosa.

Finalmente, en la fermentación de los hidrolizados la producción de xilitol fue 58,84 g/L, con un $Y_{P/S}$ de 0,73 g/g y una Q_P 1,14g/L/h para el pre-tratamiento alcalino y una concentración máxima de 37,16 g/L de xilitol con un rendimiento de 0,76 g/g y una Q_P de 0,29 g/L/h para el pre-tratamiento de explosión con vapor. El parámetro de escalamiento k_{La} , determinado experimentalmente, fue 15 h⁻¹.

Palabras clave: cascarilla de cebada, xilitol, explosión con vapor, pre-tratamiento alcalino, arabinoxilanos, hidrólisis enzimática, biorrefinería.

Abstract

In the bioeconomy context, phase III biorefineries have as aim to obtain various products with higher value-added than biofuels, from different types of biomass, mainly agro industrial. This trend is a topic of increasing importance and it is expected to become a reality in the short term. In this research, the production of xylitol from brewer's spent grain was reached, as one of the agro industrial biomass more generated at local and global level, through two different process options that involved an alkaline or steam explosion pre-treatment, followed by the enzymatic hydrolysis of the extracted arabinoxylans in the liquid fraction and the fermentation stage of xylose to xylitol.

In the first process option, was done by first time a kinetic study of the arabinoxylans extraction in the alkaline liquid pre-treatment, the higher extraction was found in 12 hours of residence time with a 64,81%. The conditions of pre-treatment were: 40°C, 360 rpm and 1:14 relation of weight of brewer's spent grain by volume of 4 M NaOH. The first order irreversible kinetic was adjusted by the Saeman model and the activation energy was

calculated for three of the four temperatures assessed (Arrhenius equation). For the second process option was evaluated by first time an enzymatic desproteinization and destarching stage previous to the steam explosion pretreatment, 47% was the higher yield reached in the operation at 173°C x 15,5 min (optimal conditions) with a 0,5% w/v H₂SO₄ impregnation.

After that, to evaluate the synergy between seven enzymes, an enzymatic hydrolysis was made over the arabinoxylans extracted in the liquid fraction by two different options. The enzymes were endo-1,4- β -xylanase from the families GH10 y GH11, α -L-arabinofuranosidase from the families GH51 y GH43, β -xylosidase, α -D-glucuronidase, acetyl xylane and feruloyl esterases or the enzymatic commercial complex CellicTM Ctec I supplemented with β -xylosidase. The liberation of xylose was calculated through the reaction yield, the higher yield for arabinoxylan extracted from the alkaline pretreatment was 63,63% and for the second pretreatment was 78-86%, highlighting for first time the enzymatic hydrolysis of liquid fraction with a xylose potential of 60 g/L from the steam explosion pretreatment.

Finally, xylitol was produced in 58,84 g/L with a $Y_{P/S}$ of 0,73 g/g and Q_P 1,14g/L/h for the first process and 37,16 g/L with a $Y_{P/S}$ of 0,76 g/g and Q_P 0,29 g/L/h for the second process. The scale-up parameter, k_La was determined experimentally as 15 h⁻¹.

Key words: brewer's spent grain, xylitol, steam explosion, alkaline pretreatment, arabinoxylans, enzymatic hydrolysis, biorefinery.

Contenido

Pág.

Resumen	IX
Abstract X	
Contenido	XI
Lista de figuras	XV
Lista de tablas	XXI
Lista de símbolos y abreviaturas	XXIII
Introducción	1
1. Capítulo 1. Estado del arte	9
1.1 Proceso de producción de cerveza	9
1.1.1 Cascarilla de cebada, co-producto del proceso cervecero	11
1.2 Generalidades de la biomasa lignocelulósica	13
1.2.1 Estructura de los materiales lignocelulósicos	13
1.3 Enzimas involucradas en la hidrólisis de la hemicelulosa (tipo arabinoxilano)	19
1.4 Proceso de fabricación de productos de valor agregado a partir de biomasa lignocelulósica	24
1.4.1 Desarrollos y avances en pre-tratamientos sobre la cascarilla de cebada, énfasis pre-tratamiento alcalino y explosión con vapor	26
1.4.2 Extracción de la fracción de proteína presente en la cascarilla de cebada	31
1.5 Inhibidores de fermentación y métodos de detoxificación	33
1.6 Hidrólisis enzimática de la cascarilla de cebada y otras biomاسas lignocelulósicas	36
1.7 Situación actual y usos potenciales de la cascarilla de cebada	37
1.8 Xilitol	38
1.8.1 Proceso de producción de xilitol	40
1.8.2 Bioquímica de la producción de xilitol (énfasis en levaduras)	44
1.8.3 Condiciones para la producción de xilitol a partir de <i>C. guilliermondii</i>	47
1.8.4 El mercado del xilitol	49
2. Capítulo 2. Planteamiento del problema	53
2.1 Planteamiento del problema	53
2.2 Hipótesis	55
2.3 Objetivos	55

2.3.1	Objetivo general	55
2.3.2	Objetivos específicos.....	55
2.4	Metodología (estrategia general)	56
3.	Capítulo 3. Primera opción de proceso: pre-tratamiento alcalino	59
3.1	Resumen	59
3.2	Materiales y métodos	61
3.2.1	Adecuación de la cascarilla de cebada.....	61
3.2.2	Caracterización de la cascarilla de cebada	61
3.2.3	Pre-tratamiento alcalino	63
3.2.4	Seguimiento de la reacción a través del tiempo	64
3.2.5	Análisis estadístico	65
3.2.6	Teoría del modelamiento para la cinética de extracción	65
3.2.7	Extracción de los arabinoxilanos.....	67
3.2.8	Caracterización de los arabinoxilanos extraídos	68
3.2.9	Hidrólisis enzimática	69
3.2.10	Fermentación.....	72
3.2.11	Métodos analíticos.....	73
3.3	Resultados y discusión de resultados	74
3.3.1	Caracterización de la cascarilla de cebada	74
3.3.2	Pre-tratamiento alcalino	75
3.3.3	Seguimiento de extracción de los grupos acetilo a través del tiempo	83
3.3.4	Cinética de extracción	86
3.3.5	Extracción de proteína.....	89
3.3.6	Cuantificación de compuestos derivados del furano y fenólicos.....	90
3.3.7	Caracterización del material pre-tratado WIS.....	96
3.3.8	Análisis SEM.....	100
3.3.9	Precipitación alcohólica de AX.....	102
3.3.10	Caracterización de la fracción de AX extraídos.....	102
3.3.11	Caracterización de enlaces glucosídicos de los AX extraídos	104
3.3.12	Hidrólisis enzimática	105
3.3.13	Fermentación.....	119
3.4	Conclusiones.....	120
3.5	Recomendaciones	122
4.	Capítulo 4. Segunda opción de proceso: pre-tratamiento de explosión con vapor .	125
4.1	Resumen	125
4.2	Materiales y métodos	127
4.2.1	Adecuación de la cascarilla de cebada.....	127
4.2.2	Caracterización de la cascarilla de cebada original, desproteinizada y de los sólidos pre-tratados.....	127
4.2.3	Desproteización y eliminación de almidón.....	127
4.2.4	Pre-tratamiento de explosión con vapor	129
4.2.5	Hidrólisis enzimática	133
4.2.6	Hidrólisis enzimática de los WIS pre-tratados	140
4.2.7	Fermentación.....	140
4.2.8	Métodos analíticos.....	141
4.3	Resultados y discusión de resultados	142
4.3.1	Caracterización de la cascarilla de cebada	142

4.3.2	Definición del intervalo de estudio para las variables de interés en el pre-tratamiento de SE	144
4.3.3	Desproteización y eliminación de almidón	148
4.3.4	Caracterización de la cascarilla de cebada desproteizada	152
4.3.5	Pre-tratamiento de explosión con vapor	153
4.3.6	Punto óptimo a las condiciones evaluadas	169
4.3.7	Hidrólisis enzimática	171
4.3.8	Fermentación	196
4.4	Conclusiones	206
4.5	Recomendaciones	208
5.	Capítulo 5. Conclusiones y recomendaciones	211
5.1	Conclusiones	211
5.2	Recomendaciones	215
A.	Anexo: Fichas técnicas enzimas puras	217
B.	Anexo. Curvas típicas para la determinación de k_{La}	228
C.	Anexo. Curva de calibración para <i>C. guilliermondii</i>	229
D.	Anexo. Análisis estadístico del modelo de medidas repetidas	230
E.	Anexo. Rendimiento máximo de arabinosa y AX en función de las variables del diseño experimental: concentración NaOH, temperatura y agitación	234
F.	Anexo. Curvas y ajuste de los datos experimentales para los azúcares monoméricos por separado: xilosa y arabinosa, según el modelo de Saeman	235
G.	Anexo. Análisis estadístico ANACOVA	239
H.	Anexo. Caracterización de los líquidos de pre-tratamientos del SE, en cuanto a la concentración de los azúcares neutros libres y azúcares totales	244
I.	Anexo. Análisis estadístico modelo factorial 2*2 para los ensayos de SE	245
	Bibliografía	252

Lista de figuras

Pág.

Figura 1-1. Esquema del proceso de obtención de cascarilla de cebada a partir de cebada natural	10
Figura 1-2. Representación esquemática de las estructuras de los tres principales tipos de hemicelulosas. A. Xilano, B. Xiloglucano, C. Galactomanano	15
Figura 1-3. Modelo de la pared celular de fibras de maíz.....	18
Figura 1-4. Representación esquemática de la acción coordinada de hemicelulasas sobre los enlaces de la hemicelulosa hasta compuestos monoméricos.	20
Figura 1-5. Esquema de la hidrólisis enzimática de glucuronoxilanos extraídos alcalinamente, por xilanasas GH de la familia 10 y 11. Las enzimas generan fragmentos neutros y ácidos. Solamente se muestran los oligosacáridos ácidos, ácidos aldourónicos y su hidrólisis a monosacáridos por la acción de la β -xilosidasa y α -glucuronidasas de la familia GH67 y GH115.....	22
Figura 1-6. Esquema de la hidrólisis enzimática de glucuronoxilano extraído alcalinamente por xilanasas GH de la familia 10 y 11. Solo se muestran fragmentos arabinosilados. La hidrólisis a monosacáridos requiere de la acción de dos tipos de α -L-arabinofuranosidasas y β -xilosidasas. Las α -L-arabinofuranosidasas son típicamente activas o en la posición 2 o 3 de los residuos de Xylp monoarabinosilados (enzimas tipo m2,3 de las familias GH43, GH51, GH54 y GH62) o sobre residuos doblemente sustituidos (enzimas tipo d2,3, algunas GH43 y una GH51), las cuales liberan solamente la Araf de la posición 3.	23
Figura 1-7. Esquema que ilustra las técnicas de extracción y fraccionamiento integradas para proteínas y péptidos empleados en proteómica en alimentos	25
Figura 1-8. Reacciones que ocurren durante la hidrólisis de materiales lignocelulósicos. Los derivados del furano y los compuestos fenólicos pueden reaccionar adicionalmente para formar algunos materiales poliméricos	34
Figura 1-9. Resumen de varias estrategias de detoxificación aplicadas a hidrolizados de materiales lignocelulósicos, para la producción de xilitol	35
Figura 1-10. Estructura química del xilitol	39
Figura 1-11. Ruta química para la producción de xilitol.....	41
Figura 1-12. Diagrama de proceso para la producción biotecnológica de xilitol desde un material lignocelulósico. Adaptado de Wei et al., (2010)	42
Figura 1-13. Ruta metabólica de xilitol en levaduras	45
Figura 1-14. Mercado global de xilitol para la industria de gomas de mascar (2009-2020) por región en toneladas.	49

Figura 3-1. Diagrama de operaciones simplificado del proceso de obtención de xilitol a partir de cascarilla de cebada, a través del pre-tratamiento con NaOH.....	60
Figura 3-2. Esquema del reactor utilizado en el pre-tratamiento alcalino	64
Figura 3-3. pH óptimo para las diferentes actividades enzimáticas empleadas en el ensayo de hidrólisis enzimática. α -L-Arabinofuranosidasa de <i>Aspergillus niger</i> (An AFase), α -L-Arabinofuranosidasa de <i>U. maydis</i> (Um AFase), α -L-Arabinofuranosidasa de <i>Bifidobacterium adolescentis</i> (Ba AFase), β -xilosidasa de <i>Selenomonas ruminantium</i> (Sr XOSase) y endo-1,4- β -xilanasas de <i>N. patriciarum</i> (Np XYLase)	70
Figura 3-4. Rendimiento de extracción de los azúcares a través del tiempo para el ensayo grado severo, nivel bajo, a 10,5 horas de reacción	76
Figura 3-5. Rendimiento de extracción de los azúcares a través del tiempo para el ensayo grado severo, nivel alto a 2 horas de reacción	77
Figura 3-6. Rendimiento de extracción de los azúcares a través del tiempo para el ensayo grado moderado, nivel bajo a 12 horas de reacción.....	78
Figura 3-7. Rendimiento de extracción de los azúcares a través del tiempo para el ensayo grado moderado, nivel alto a 24 horas de reacción.....	78
Figura 3-8. Rendimiento máximo de extracción de glucosa (barras naranjas), xilosa+galactosa+manosa (barras amarillas), arabinosa (barras verdes) y AX: suma de xilosa+galactosa+manosa+arabinosa (barras cafés)	79
Figura 3-9. Rendimiento máximo de xilosa en función de las variables del diseño experimental: concentración NaOH, temperatura y agitación	82
Figura 3-10. Cinética de la liberación de los grupos acetilo (expresados como ácido acético) extraídos.....	85
Figura 3-11. Datos experimentales de la concentración de AX extraídos en el líquido de pre-tratamiento y datos predichos por el modelo de Saeman para los ensayos (A) Severo nivel bajo y (B) Severo nivel alto	86
Figura 3-12. Datos experimentales de la concentración de AX extraídos en el líquido de pre-tratamiento y datos predichos por el modelo de Saeman para los ensayos (C) Moderado nivel bajo y (D) Moderado nivel alto.....	87
Figura 3-13. Ajuste de la ecuación de Arrhenius para las constantes cinéticas (A) k_1 y (B) k_2 encontradas con el modelo de Saeman para la extracción de los AX mediante el pre-tratamiento alcalino a las temperaturas 40, 60 y 90°C	88
Figura 3-14. Proteína total en base seca de la biomasa original y después del pre-tratamiento con NaOH	90
Figura 3-15. Puntos de ataque propuestos () de los radicales de hidroxilo en la descomposición de las estructuras lignocelulósicas presentes en la cascarilla de cebada durante el pretratamiento alcalino	91
Figura 3-16. Concentración de ácido p-cumárico y ferúlico liberados a tiempo final del pre-tratamiento con NaOH	93
Figura 3-17. Cinética de liberación de ácido p-cumárico y ferúlico a través del tiempo para el ensayo grado severo, nivel bajo por 2,5 horas de reacción	94
Figura 3-18. Cinética de liberación de ácido p-cumárico y ferúlico a través del tiempo para el ensayo severo, nivel alto por 2 horas de reacción.....	95

Figura 3-19. Micrografías por SEM, de la cascarilla de cebada sin pre-tratamiento (A) y pre-tratada a tiempo final para los ensayos: severo nivel bajo (B), severo nivel alto (C), moderado nivel bajo (D) y moderado nivel alto (E) a 100 μm	101
Figura 3-20. Precipitación de AX con etanol a diferentes proporciones.....	102
Figura 3-21. Precipitación de AX con metanol a diferentes proporciones.....	102
Figura 3-22. Curva de progreso para la liberación de xilosa, ensayos I al V a 90 minutos de reacción. Ensayo I (todas las enzimas), Ensayo II (todas las enzimas menos endo-1,4- β -xilanasa GH11), Ensayo III: (todas las enzimas menos endo-1,4- β -xilanasa GH10), Ensayo IV (todas las enzimas menos α -L-arabinofuranosidasa GH43), Ensayo V (todas las enzimas menos α -L-arabinofuranosidasa GH51)	106
Figura 3-23. Curva de progreso para la liberación de xilosa, ensayos I al V a 48 horas de reacción. Ensayo I (todas las enzimas), Ensayo II (todas las enzimas menos endo-1,4- β -xilanasa GH11), Ensayo III: (todas las enzimas menos endo-1,4- β -xilanasa GH10), Ensayo IV (todas las enzimas menos α -L-arabinofuranosidasa GH43), Ensayo V (todas las enzimas menos α -L-arabinofuranosidasa GH51)	107
Figura 3-24. Curva de progreso para la liberación de xilosa, ensayos I, VI al IX a 90 minutos de reacción (A) y 48 horas de reacción (B). Ensayo I (todas las enzimas), Ensayo VI (todas las enzimas menos endo-1,4- β -xilanasa GH11 y α -L-arabinofuranosidasa GH43), Ensayo VII: todas las enzimas menos endo-1,4- β -xilanasa GH11 y α -L-arabinofuranosidasa GH51), Ensayo VIII (todas las enzimas menos endo-1,4- β -xilanasa GH10 y α -L-arabinofuranosidasa GH43), Ensayo IX (todas las enzimas menos endo-1,4- β -xilanasa GH10 y α -L-arabinofuranosidasa GH51).	108
Figura 3-25. Rendimiento de xilosa en la hidrólisis enzimática a través del tiempo, sin la adición de una enzima. Ensayo I (todas las enzimas), Ensayo II (todas las enzimas menos endo-1,4- β -xilanasa GH11), Ensayo III: (todas las enzimas menos endo-1,4- β -xilanasa GH10), Ensayo IV (todas las enzimas menos α -L-arabinofuranosidasa GH43), Ensayo V (todas las enzimas menos α -L-arabinofuranosidasa GH51)	109
Figura 3-26. Rendimiento de xilosa en la hidrólisis enzimática a través del tiempo, sin la adición de dos enzimas. Ensayo I (todas las enzimas), Ensayo VI (todas las enzimas menos endo-1,4- β -xilanasa GH11 y α -L-arabinofuranosidasa GH43), Ensayo VII: (todas las enzimas menos endo-1,4- β -xilanasa GH11 y α -L-arabinofuranosidasa GH51), Ensayo VIII (todas las enzimas menos endo-1,4- β -xilanasa GH10 y α -L-arabinofuranosidasa GH43), Ensayo IX (todas las enzimas menos endo-1,4- β -xilanasa GH10 y α -L-arabinofuranosidasa GH51).	110
Figura 3-27. Liberación de xilosa a través del tiempo a diferentes concentraciones de sustrato	117
Figura 3-28. Rendimiento de xilosa a través del tiempo a diferentes concentraciones de sustrato	117
Figura 3-29. Liberación de arabinosa a través del tiempo a diferentes concentraciones de sustrato	118
Figura 3-30. Rendimiento de arabinosa a través del tiempo a diferentes concentraciones de sustrato	119

Figura 3-31. Perfiles de crecimiento celular, consumo de xilosa y arabinosa y producción de xilitol y arabitol, ensayo en reactores de 1 L con k_{La} de $15h^{-1}$.	120
Figura 4-1. Diagrama de operaciones simplificado del proceso de obtención de xilitol a partir de cascarilla de cebada empleando SE.	126
Figura 4-2. Diagrama de flujo para el sistema de explosión con vapor ubicado en la Unidad de Biocarburantes del CIEMAT (Madrid-España).	130
Figura 4-3. Esquema de deacetilación de los acetilglucuronoxilanos (la segunda cadena desde arriba) por las acetil-xilano esterasas de las familias CE 1, 4, 5 y 6 y la degradación posterior de las xilanasas GH10 y GH11. Las acetil-xilano esterasas no atacan el grupo 3-O-acetilo de los residuos sustituidos con MeGlcA. Los residuos de Xylp doblemente sustituidos no sirven como sustrato para las acetilxilano esterasas CE4. Las xilanasas de las familias GH10 y 11 generan los mismos ácidos aldourónicos del xilano acetilado (Figura 1-5; MeGlcA ³ Xyl ₃ and MeGlcA ³ Xyl ₄ , respectivamente), pero también aquellos que están 3-O-acetilados en el residuo de Xylp sustituido con MeGlcA (fórmulas en la parte inferior).	137
Figura 4-4. Representación esquemática de la gelificación de proteínas y efecto de la hidrólisis enzimática sobre las mismas. La gelificación a menudo es inducida por un proceso térmico, donde la proteína nativa se desnaturaliza y puede formar una red que se mantiene unida mediante enlaces covalentes, interacciones iónicas e interacciones hidrófobas. Estas dos últimas interacciones pueden verse favorecidas por la hidrólisis enzimática, pero la capacidad de formación de la red de proteínas suele estar ya muy alterada debido a una disminución en la masa molecular promedio (Wouters, Rombouts, Fierens, Brijs, & Delcour, 2016).	148
Figura 4-5. Variación del pH durante la hidrólisis enzimática de la cascarilla de cebada empleando Alcalase® 2.5 L a nivel de laboratorio a 60°C, 10% p/p de carga de sólidos y 200 rpm.	149
Figura 4-6. Rendimiento de desproteinización para la hidrólisis enzimática de cascarilla de cebada con Alcalase® 2.5 L a nivel de laboratorio a 60 °C, 10% de carga de sólidos y 200 rpm.	150
Figura 4-7. Porcentaje de azúcares libres (barras naranja) y azúcares neutros potenciales totales para hidrólisis (barras amarillas) obtenidos en el líquido de pre-tratamiento de la cascarilla de cebada desproteinizada sometida al SE, (A) Glucosa, (B) xilosa, (C) arabinosa y (D) azúcares totales (Glu+Xil+Ara).	154
Figura 4-8. Rendimiento de recuperación de los sólidos WSS (barras azules), WIS (barras verdes) y pérdidas (barras amarillas).	158
Figura 4-9. Rendimiento de los azúcares: glucosa (A), xilosa (B) y arabinosa (C) en el sólido (barras azules), líquido (barras naranjas) y perdidas (barras grises) para los ocho ensayos de SE sobre la cascarilla de cebada desproteinizada.	159
Figura 4-10. Distribución de los inhibidores de fermentación para los diferentes ensayos SE1-SE8.	168
Figura 4-11. Superficie de respuesta estimada maximizando el rendimiento y concentración de xilosa en el líquido de pre-tratamiento de SE.	169

Figura 4-12. Rendimientos de azúcares liberados: xilosa y arabinosa después de la HE con el líquido crudo proveniente del SE en el punto óptimo.....	173
Figura 4-13. Rendimientos de azúcares liberados: xilosa y arabinosa después de la HE en el líquido concentrado 5,5 veces	174
Figura 4-14. Rendimientos de azúcares liberados: xilosa y arabinosa después de la HE, ensayo preliminar con el líquido concentrado 5,5 veces	176
Figura 4-15. Rendimiento de xilosa liberada después de la HE con el líquido 5,5 veces concentrado, teniendo en cuenta la adición de actividades esterasas y tres dosificaciones diferentes	178
Figura 4-16. Rendimiento de arabinosa liberada después de la HE con el líquido 5,5 veces concentrado, teniendo en cuenta la adición de actividades esterasas y tres dosificaciones diferentes	180
Figura 4-17. Vía de degradación de los ácidos aldourónicos acetilados generados a partir de acetilglucuronoxilanos por las xilanasas GH10 y GH11. El ácido aldotetraurónico 3-O-acetilado ($\text{Ac}^3\text{MeGlcA}^3\text{Xyl}^3$) puede ser desacetilado directamente por algunas desacetilasas CE16, por ejemplo, por la CE16 de <i>Trichoderma reesei</i> . Alternativamente, estas pueden ser desesterificadas por las enzimas CE16 en la forma de sus isómeros, formados por la migración del grupo acetilo a la posición 4. Queda por determinar si el ácido aldopentaurónico acetilado formado por las xilanasas GH11 ($\text{Ac}^3\text{MeGlcA}^3\text{Xyl}^3$) sirve como sustrato para la β -xilosidasa (signo de pregunta).	183
Figura 4-18. Ejemplos de arabinoxilooligosacáridos resistentes a la acción de las α -L-arabinofuranosidasas. Aún no se ha proporcionado evidencia experimental para la resistencia del compuesto con signo de interrogación.	183
Figura 4-19. Rendimientos de xilosa liberada después de la hidrólisis enzimática con el líquido 5,5 veces concentrado a dos dosis diferentes y 40°C	185
Figura 4-20. Rendimientos de xilosa liberada después de la hidrólisis enzimática con el líquido 5,5 veces concentrado a dos dosis diferentes y 50°C	185
Figura 4-21. Rendimientos de glucosa liberada después de la hidrólisis enzimática a 24 (barras azules) y 48 h (barras rojas) de reacción con enzimas comerciales en forma individual y combinada	187
Figura 4-22. Rendimientos de xilosa liberada después de la hidrólisis enzimática a 24 y 48 h de reacción con enzimas comerciales en forma individual y combinada	188
Figura 4-23. Rendimientos de arabinosa liberada después de la hidrólisis enzimática a 24 y 48 h de reacción con enzimas comerciales en forma individual y combinada	189
Figura 4-24. Rendimiento de glucosa liberada después de la hidrólisis enzimática a 24 y 72 h de reacción con la enzima Cellic TM Ctec I con y sin suplementación de β -xilosidasa	191
Figura 4-25. Rendimiento de xilosa liberada después de la hidrólisis enzimática a 24 y 72 h de reacción con la enzima Cellic TM Ctec I con y sin suplementación de β -xilosidasa .	193
Figura 4-26. Rendimiento de arabinosa liberada después de la hidrólisis enzimática a 24 y 72 h de reacción con la enzima Cellic TM Ctec I con y sin suplementación de β -xilosidasa	194
Figura 4-27. Rendimiento de HE sobre los WIS, glucosa (barras moradas) y xilosa (barras verdes) con la enzima Cellic TM Cetec II por 72 horas de reacción	195

Figura 4-28. Concentración de inhibidores de fermentación en el líquido crudo y 5,5 veces concentrado	197
Figura 4-29. Perfiles de crecimiento celular, consumo de xilosa y producción de xilitol, ensayo toxicidad sobre el líquido crudo a un pH de 4,5	198
Figura 4-30. Perfiles de crecimiento celular, consumo de xilosa y producción de xilitol, ensayo toxicidad sobre el líquido 5,5 veces concentrado a un pH de 4,5	199
Figura 4-31. Perfiles de crecimiento celular, consumo de xilosa y producción de xilitol, ensayo toxicidad sobre el líquido 5,5 veces concentrado a un pH de 5,5	199
Figura 4-32. Concentración de los compuestos inhibidores de fermentación al tiempo inicial y final de la fermentación en el biorreactor de 1 L	201
Figura 4-33. Perfiles de consumo de xilosa y glucosa, producción de xilitol (eje y-izquierdo), crecimiento celular y producción de arabitol (eje y-derecho), ensayo para el líquido 5,5 veces concentrado con k_La de 15 h^{-1}	203
Figura 4-34. Perfil de crecimiento celular, ácido acético y suma de fenólicos, producción de etanol y glicerol a través del tiempo, para la fermentación en biorreactor a 1 L.....	205

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1-1. Composición química* de la cascarilla de cebada de acuerdo con el origen en el periodo 2001 a 2016	12
Tabla 1-2. Composición de los aminoácidos de las hordeínas totales y su fracción en porcentaje mol. Los datos se basan en secuencias de longitud completa, a excepción de las hordeínas LMW	17
Tabla 1-3. Composición de la hemicelulosa de la cascarilla de cebada.....	19
Tabla 1-4. Enzimas involucradas en la hidrólisis del complejo heteroarabinosilano	21
Tabla 1-5. Mayores compañías productoras de xilitol en el mundo.....	50
Tabla 3-1. Diseño experimental completamente al azar 2*2 de contraste ortogonal para el pre-tratamiento alcalino	63
Tabla 3-2. Características principales de las enzimas comerciales puras estudiadas.....	69
Tabla 3-3. Definición de la adición de las enzimas y nomenclatura de los ensayos llevados a cabo para evaluar el efecto sinérgico.....	71
Tabla 3-4. Porcentaje de combinación de las enzimas utilizadas para evaluar la sinergia entre las enzimas puras.....	71
Tabla 3-5. Composición de la cascarilla de cebada proveniente de la cervecera Bavaria S.A. (materia seca, %).....	74
Tabla 3-6. Contenido de metales de la cascarilla de cebada proveniente de la cervecera Bavaria S.A.	75
Tabla 3-7. Constantes de la velocidad de reacción, error y máximo tiempo de rendimiento predichos para el modelo de Saeman.....	88
Tabla 3-8. Energía de activación para cada tipo de azúcar extraído en el pre-tratamiento alcalino, mediante la ley de Arrhenius a las temperaturas 40, 60 y 90°C	89
Tabla 3-9. Concentración de compuestos inhibidores en ppm: ácido acético, derivados del furano y compuestos fenólicos a tiempo final del pre-tratamiento con NaOH	92
Tabla 3-10. Caracterización WIS después del pre-tratamiento con NaOH a tiempo de rendimiento máximo y tiempo final de pre-tratamiento	99
Tabla 3-11. Composición de los carbohidratos de la fracción de AX extraídos a partir de la cascarilla de cebada sometida al ensayo grado moderado-nivel alto con NaOH.....	103
Tabla 3-12. Composición de los enlaces glucosídicos (% mol) de la fracción de AX extraídos, separados y purificados del pre-tratamiento grado moderado-nivel alto con NaOH sobre la cascarilla de cebada	105

Tabla 4-1. Ensayos para definir las condiciones de operación del pretratamiento de la cascarilla de cebada por SE	132
Tabla 4-2. Diseño experimental factorial multinivel para los ensayos definitivos del pretratamiento de SE sobre la cascarilla de cebada desproteinizada con y sin impregnación de ácido	133
Tabla 4-3. Enzimas puras comerciales utilizadas para realizar la HE sobre el líquido crudo obtenido directamente del SE y para el segundo sustrato, líquido concentrado 5,5 veces.	134
Tabla 4-4. Porcentaje de combinación de enzimas puras adicionadas sobre el líquido concentrado 5,5 veces (ensayo pre-liminar)	135
Tabla 4-5. Porcentaje de combinación de enzimas puras adicionadas a la mezcla de enzimas más dos nuevas actividades enzimáticas tipo estearasas.....	137
Tabla 4-6. Resumen de las características de los cocteles enzimáticos evaluados	139
Tabla 4-7. Actividades enzimáticas presentes en los cocteles enzimáticos Celluclast 1.5 L y Ultraflo a pH 5, 50°C	139
Tabla 4-8. Definición de los ensayos con enzimas comerciales en forma individual y combinada.....	139
Tabla 4-9. Composición de la cascarilla de cebada proveniente de la cervecería Mahou (materia seca, %).....	142
Tabla 4-10. Rendimiento de xilosa para los ensayos que permitieron definir el intervalo de estudio para el pre-tratamiento de SE.....	145
Tabla 4-11. Azúcares neutros obtenidos en el líquido resultante de la desproteinización de la cascarilla de cebada, ensayo en reactor de 40 L.....	152
Tabla 4-12. Composición de la cascarilla de cebada desproteinizada (materia seca, %)	152
Tabla 4-13. Concentración de los compuestos inhibidores de fermentación	167
Tabla 4-14. Caracterización del líquido de pre-tratamiento del SE en el punto óptimo, en cuanto a los azúcares neutros libres y potenciales de hidrólisis	170
Tabla 4-15. Composición promedio de los WIS obtenidos en el punto óptimo 173,5°C, 15,5 min y 0,5% p/v H ₂ SO ₄).....	171
Tabla 4-16. Caracterización compuestos inhibidores en el líquido de pre-tratamiento, para el punto óptimo (173,5°C, 15,5 min y 0,5% p/v H ₂ SO ₄)	171
Tabla 4-17. Caracterización del líquido crudo y concentrado 5,5 veces para la HE	172
Tabla 4-18. Caracterización del líquido 5,5 veces concentrado inicial y final después de la HE, ensayo preliminar en cuanto el contenido de ácido acético, ferúlico y cumárico	177

Lista de símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
$Y_{P/S}$	Rendimiento producto a sustrato	g/g	Rendimiento xilosa a xilitol
Q_P	Productividad	g/L/h	Productividad de xilitol
$k_{L,a}$	Coeficiente de transferencia de oxígeno	h^{-1}	Ec. 3-7
t	tiempo	h	
P_i	Fosfato inorgánico		Ec. 1-1
k_1	Constante de velocidad de polímeros a monómeros	h^{-1}	Ec. 3-2
k_2	Constante de velocidad de los monómeros a los productos de degradación	h^{-1}	Ec. 3-3
P	Concentraciones de los azúcares poliméricos	g/L	Ec. 3-3
C_m	Concentración de azúcares monoméricos	g/L	Ec. 3-3, 3-4 y 3-5
P_0	Concentración inicial de polímero	g/L	Ec. 3-4 y 3-5
Y	Rendimiento de azúcares monoméricos, en porcentaje	%	Ec. 3-5
k_i	Constante de la velocidad de reacción	min^{-1}	Ec. 3-6
A_i	Factor pre-exponencial	min^{-1}	Ec. 3-6
E_a	Energía de activación	J/mol	Ec. 3-6
R	Constante de los gases	J/mol/K	Ec. 3-6
T	Temperatura	K	Ec. 3-6

Subíndices

Subíndice	Término
n	n Xylp residuos: 1,2, etc.
subst	Xyl sustituidos
total	Xyl total

Abreviaturas

Abreviatura	Término
ACE	<i>Angiotensin Converting Enzyme</i> (enzima convertidora de angiotensina)
ADP	<i>Adenosine diphosphate</i> (difosfato de adenosina)
AGPs	Proteínas ricas en arabinogalactanos
ANOVA	Análisis de Varianza
ANACOVA	Análisis de Covarianza
Araf	<i>L-arabinofuranoxyl residue</i> (residuo L-arabinofuranosil)
ATP	Trifosfato de adenosina
ATPasa	Clase de enzimas que catalizan la descomposición de ATP en ADP y un ion de fosfato libre
AX	Arabinoxilanos
CE	<i>Carbohydrate esterase</i> (carbohidrato estearasa)
DANE	Departamento Nacional de Estadística
DB	<i>Degree of Branching</i> (grado de ramificación)
DP	<i>Degree of polymerization</i> (grado de polimerización)
ESI-MS	<i>Electrospray ionization- Mass Spectrometry</i> (ionización por elctroaspersión- espectrometría de masas)
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i> (Administración de drogas y alimentos de los Estados Unidos de América)
FeA ² Xyl ₂ ; FAXX	<i>Feruloil arabinoxylobiose</i> (Feruloil arabinoxilobiosa)
FID	<i>Flame Ionization Detector</i> (detector de ionización de flama)
GC	<i>Gas chromatography</i> (cromatografía de gases)
GH	Hidrolasas glucosídicas
Glc	Glucosa
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i> (generalmente reconocido como seguro)
GRPs	Proteínas ricas en glicina
HE	Hidrólisis Enzimática
HMF	Hidroximetilfurfural
HPAEC-PAD	<i>High performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection</i> (cromatografía de intercambio aniónico de alta eficacia con detección de pulso ampérométrico)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (cromatografía líquida de alta eficacia)
HRGPs	Glicoproteínas ricas en hidroxiprolina
kDa	kilo Dalton
LMW	<i>Low Molecular Weight</i> (Bajo peso molecular)
MeGlcA	<i>4-O-methyl-D-glucuronic acid</i> (ácido 4-O-metil-D-glucurónico)
MeGlcA ³ Xyl ₃	Ácido aldotetraurónico
MeGlcA ³ Xyl ₄	Ácido aldopentaurónico
NADH o NAD	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
NADPH o NADP+	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NREL	<i>National Renewable Energy Laboratory</i> (Laboratorios nacionales de energías renovables)
OTR	<i>Oxygen Transfer Rate</i> (velocidad de transferencia de oxígeno)
pHi	pH intracelular

Abreviatura	Término
Pi	Punto isoeléctrico
pKa	Logaritmo negativo de la constante de disociación ácida de un ácido débil
PRPs	Proteínas ricas en prolina
qO ₂	Tasa específica de consumo de oxígeno
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> (electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio)
SE	<i>Steam explosion</i> (explosion con vapor)
WIS	<i>Water Insoluble Solids</i> (sólidos insolubles en agua)
XDH	Xilitol deshidrogenasa
XOS	Xilo-oligosacáridos
XR	Xilosa-D-reductasa
Xylp	<i>D-xylopyranosyl residue</i> (residuo D-xilopiranososa)
YAra	Rendimiento de arabinosa
YGlc	Rendimiento de glucosa
YPG	<i>Yeast extract, peptone agar</i> (agar de extracto de levadura y peptona)
YXil	Rendimiento de xilosa

Introducción

La creciente demanda energética mundial sumada a la inminente escasez de fuentes fósiles de energía y productos químicos, ha impulsado el desarrollo de alternativas tipo renovable, entre las que se destaca el uso de biomasa. La biomasa es el material biológico proveniente de organismos vivos o que estuvieron recientemente vivos. En el contexto de la biomasa útil para producción de energía a menudo se hace alusión a plantas o materiales derivados de las mismas¹. Según la Comisión Europea, hay varios recursos provenientes de la biomasa tales como productos y sub-productos, cuyo origen principalmente se deriva de árboles, plantas y residuos agrícolas, industriales o urbanos².

El reemplazo del petróleo por biomasa como materia prima para la producción de combustibles y químicos es una opción interesante que se ha convertido en la fuerza impulsora para el desarrollo de complejos industriales denominados biorrefinerías (Cherubini, 2010). Las características potenciales de la biomasa, como su abundancia natural, renovabilidad, reciclabilidad y facilidad de acceso durante todo el año alrededor del mundo, está impulsando especialmente el uso de biomasa residual como material sostenible para fabricar productos de alto valor agregado. En este contexto, muchos esfuerzos significativos están realizándose en la sociedad para transitar de la economía a una bio-economía, con el objetivo de desarrollar procesos que sean sostenibles, socialmente aceptables y respetuosos con el medio ambiente (Arevalo-Gallegos, Ahmad, Asgher, Parra-Saldivar, & Iqbal, 2017).

A nivel mundial, dentro de las biomasa potenciales para obtener diferentes bio-productos, se destacan los residuos generados en las plantas industriales de fabricación de cerveza por la capacidad de producción y su demanda constante. La producción global de esta

¹ Biomass Energy Center. Biomassenergycentre.org.uk Recuperado el 03-08-2015

² European Commission. Ec.europa.eu/energy Recuperado el 03-08-2015

bebida alcohólica se estimó en 1.909.187.000 hL para el año 2016, donde Colombia ocupó el puesto 21 con una producción de 1.910.000 kL (Kirin Beer University Report, 2017) y el tercero en Latinoamérica después de países como Brasil y México. Los co-productos sólidos generados en la elaboración de la cerveza, pueden clasificarse en residuos orgánicos, generales y peligrosos. Dentro de la primera categoría se destaca la cascarilla de cebada, coloquialmente llamada “afrecho”, por ser el residuo más abundante, ya que representa aproximadamente el 85% (p/p) del total (Steiner, Procopio, & Becker, 2015). En relación con la fabricación de cerveza se estima que en Colombia se producen 10 kg/hL (Rodríguez, 2015) de cascarilla húmeda (~80% de humedad) lo que permite estimar un valor nacional de 191.000 t. Sin embargo, varias fuentes reportan una producción de 20 kg/hL, lo que duplicaría la producción nacional y permitiría estimar la producción mundial de cascarilla de cebada en 38,6 millones de t (Mussatto, Dragone, & Roberto, 2006; Xiros & Christakopoulos, 2012; McCarthy et al., 2013; Steiner et al., 2015).

La cascarilla de cebada está compuesta principalmente por lignina, celulosa y hemicelulosa, aunque también tiene proteínas y lípidos. Con base en su composición, la gran cantidad generada y su bajo costo, USD 42/tonelada (Mussatto, Moncada, Roberto, & Cardona, 2013), COP 220/kg en base húmeda y COP 850/kg en base seca en Colombia³, se identifica la importancia de buscar alternativas de aprovechamiento y valorización de este co-producto (Xiros & Christakopoulos, 2012), ya que tradicional y actualmente, solo se emplea para elaborar concentrados para animales (Dung, Manh, & Udén, 2002; Mussatto et al., 2006; Bavaria, 2013; Steiner et al., 2015).

En los últimos años, ha crecido el interés por utilizar la cascarilla de cebada como ingrediente y/o aditivo en formulaciones destinadas al consumo humano (Reis et al., 2014; Connolly, Piggott, & FitzGerald, 2014; Steiner et al., 2015;). Otros usos potenciales se enfocan en la producción de energía o carbón (Mussatto et al., 2010), como componente

³ Beneficios y cuidados a la hora de suministrar afrecho de cerveza.
<http://www.contextoganadero.com/ganaderia-sostenible/beneficios-y-cuidados-la-hora-de-suministrar-afrecho-de-cerveza> Recuperado 26-05-2018

de ladrillos, para la fabricación de papel (Mussatto, Rocha, & Roberto, 2008) o inclusive como adsorbente (Kordialik-Bogacka, 2014). Finalmente, un gran número de investigaciones la utilizan como sustrato en diferentes procesos biotecnológicos para generar bio-productos de mayor valor agregado, tales como enzimas, bio-etanol, ácido láctico, ácidos hidroxicinámicos, xilitol, etc. (Mussatto et al., 2006; Aliyu & Bala, 2011; Pejin, Radosavljević, Mojović, Kocić-Tanackov, & Djukić-Vuković, 2015).

Un uso potencial de la cascarilla de cebada es producir xilitol, un edulcorante con alto potencial de aplicación tanto en la industria de alimentos como en la farmacéutica, ya que tiene 40% menos de calorías que la sacarosa, no participa en las reacciones de Maillard, no produce caries y es tolerado por la población diabética (de Albuquerque, da Silva, de Macedo, & Rocha, 2014). De acuerdo con el estudio realizado por el Departamento de Energía de los Estados Unidos, el xilitol se encuentra dentro de las doce moléculas químicas plataforma para biorrefinerías. Estas pueden producirse vía biológica o química a partir de los azúcares presentes en la biomasa, y son la base para formar moléculas más útiles que tendrían un alto potencial comercial y por ende generarían mayor valor agregado (U.S. Department of Energy, 2004).

Actualmente la producción de xilitol a gran escala se realiza mediante la hidrogenación catalítica de la D-xilosa pura. Sin embargo, el alto grado de pureza que debe tener la materia prima sumado a las condiciones de temperatura (80-140°C) y presión (>50 atm) de la etapa de reacción y el consumo de energía, en las etapas de separación y purificación necesarias para alcanzar el grado de pureza requerido del producto final, implican altos costos de producción (Goli, Panda, & Linga, 2012).

Para la obtención de xilitol a partir de la cascarilla de cebada residual, debe realizarse un proceso que generalmente consta de varias etapas: extracción, pre-tratamiento, hidrólisis, detoxificación, concentración, fermentación y cristalización (Wei, Yuan, Wang, & Wang, 2010). Estas etapas de proceso tienen como objetivo, en primera instancia, extraer y/o recuperar las proteínas, degradar la lignina para tener disponible la celulosa y la hemicelulosa. Posteriormente, los polisacáridos libres pueden hidrolizarse hasta sus oligómeros o monómeros por la acción de catalizadores químicos o biológicos. Finalmente, los azúcares simples obtenidos (glucosa, xilosa, arabinosa, etc.) pueden fermentarse hasta bio-productos de mayor valor agregado como, por ejemplo, el xilitol.

La producción de xilitol está expandiéndose a nivel global y se estima una fuerte demanda de este producto en los próximos años. El mercado global del xilitol se estimó en 190,9 mil t, con un valor de USD \$ 725,9 millones en 2016, y se espera que alcance las 266,5 mil t valoradas en poco más de USD \$1000 millones para 2022⁴. Los mayores productores de xilitol a nivel mundial son China y Estados Unidos. Comercialmente se encuentran precios de venta del xilitol en USD \$7,5/lb o USD \$4,5/lb a granel, a partir de abedules norteamericanos⁵.

En Colombia, la fabricación de productos de alto valor agregado a partir de biomasa residuales se encuentra poco desarrollada. El enfoque principal del aprovechamiento de la biomasa hasta el momento en el país se ha destinado para la producción de energía⁶.

Así, el principal objetivo de este trabajo fue evaluar la posibilidad de producir xilitol a partir de cascarilla de cebada empleando dos alternativas de procesos. Los dos procesos evaluados integran una etapa de pre-tratamiento físico-químico y dos etapas biotecnológicas. Para extraer la mayor cantidad de la fracción de la hemicelulosa en el líquido se plantearon dos pre-tratamientos: alcalino o de explosión con vapor. Posteriormente en la segunda etapa del proceso se buscó obtener el mayor grado de producción de xilosa a través del estudio de la hidrólisis enzimática de las fracciones de hemicelulosa. Finalmente se evaluó la fermentación del hidrolizado obtenido en un reactor de un litro para la producción de xilitol.

Los resultados demostraron que se produjo xilitol a partir de los dos procesos diseñados utilizando tanto el pre-tratamiento alcalino como de explosión con vapor. Para las dos opciones de pre-tratamiento se encontraron un conjunto de condiciones, que permitieron extraer por lo menos la mitad de la fracción de hemicelulosa en el líquido, ajustando una cinética pseudo-homogénea de primer orden por el modelo de Saeman y los parámetros de la ecuación de Arrhenius para tres de las cuatro temperaturas evaluadas en el pre-tratamiento alcalino e integrando un proceso de desproteinización enzimática previo al sometimiento de la cascarilla de cebada al pre-tratamiento de explosión con vapor.

⁴ Xylitol – A Global Market Overview. <http://industry-experts.com/verticals/food-and-beverage/xylitol-a-global-market-overview> Recuperado el 17-01-18

⁵ Xylitol: USA <http://store.xylitolusa.com/xylitol/> Recuperado el 17-01-18

⁶ En Colombia tenemos un gran potencial de producir energía por medio de biomasa: MinMinas <https://www.minminas.gov.co/historico-de-noticias?idNoticia=23881138> Recuperado el 17-01-18

Posteriormente, es de destacar que se logró la hidrólisis enzimática de un líquido concentrado 5,5 veces, procedente de la segunda opción de pre-tratamiento de explosión con vapor no solo mediante enzimas comerciales puras sino también con cocteles enzimáticos suplementados con β -xilosidasa pura, para finalmente obtener xilitol por fermentación.

Una de las ventajas de estos procesos fue que se diseñó una tecnología para evitar el efecto de los inhibidores de fermentación formados a lo largo del proceso y así prescindir de una etapa de detoxificación. Aunque los procesos planteados se enfocan en el aprovechamiento de la hemicelulosa como una de las fracciones principales de la cascarilla de cebada, para las demás fracciones obtenidas en las dos tecnologías evaluadas se definieron, al menos teóricamente como objeto de valorización dentro del contexto general de una futura biorrefinería.

Esta tesis se divide en cinco capítulos: el primero presenta una visión general del contexto nacional e internacional de la producción de cerveza y por ende de la generación de la cascarilla de cebada como su principal co-producto. Posteriormente se muestran las generalidades de la biomasa lignocelulósica y de las diferentes etapas involucradas en el proceso de valorización de estos materiales para obtener productos de mayor valor agregado. Luego se realiza una revisión de la producción, aplicaciones y mercado del xilitol tanto a nivel nacional como internacional.

En el capítulo 2 se desarrolla el planteamiento del problema de la investigación, junto con la descripción de la hipótesis, objetivos y estrategia general de la metodología realizada.

El primer proceso planteado se presenta en el capítulo 3. Este contempla el estudio cinético de la extracción y pre-tratamiento alcalino de la cascarilla de cebada para obtener hemicelulosa en el líquido del pre-tratamiento. Se evalúa, principalmente el efecto de la temperatura, concentración de NaOH, velocidad de agitación, relación de alimentación y tiempo. Posteriormente la hemicelulosa extraída en el líquido se separa del medio soluble para someterse a la etapa de hidrólisis enzimática, donde fue importante caracterizar en primera instancia la composición y los enlaces glucosídicos de esta fracción aislada. En segunda instancia, se evalúa el efecto sinérgico de la combinación de seis enzimas diferentes tipo endo-1,4- β -xilanasas, α -L-arabinofuranosidasas, β -xilosidasas y α -glucuronidasas. Una vez escogida la mejor mezcla enzimática se realiza un estudio

variando la concentración de sustrato. Finalmente, el hidrolizado obtenido se fermentó en un reactor de un litro, ajustándose el parámetro de k_{La} en el medio de reacción para proporcionar la mejor concentración de oxígeno disuelto, variable crítica en el escalamiento del proceso.

En el capítulo 4 se muestra la segunda opción de proceso desarrollada. En esta se realiza una etapa de desproteización y eliminación de almidón de la cascarilla de cebada, para que este material fuera susceptible a la explosión con vapor. En esta tecnología se evalúa la temperatura y tiempo de pre-tratamiento, parametrizando la impregnación del material con ácido. Posteriormente, el líquido de pre-tratamiento obtenido se concentra para realizar el estudio de la hidrólisis enzimática, evaluando dos opciones: (1) el uso de las enzimas puras, mencionadas previamente, con la adición de dos enzimas más con actividades específicas acetilxilano estearasa y feruloil estearasa y, (2) la evaluación de un coctel enzimático comercial suplementado o no con la actividad enzimática β -xilosidasa pura. Finalmente, se hacen ensayos de toxicidad, para el hidrolizado obtenido, variando el pH a nivel de matraz Erlenmeyer. Una vez determinadas las mejores condiciones de fermentación en este nivel, se lleva a un reactor de un litro, donde también se determina el parámetro de k_{La} , como criterio de escalamiento.

Finalmente, los hallazgos, contribuciones y conclusiones de la investigación se presentan en el capítulo 5, en donde se incluyen las implicaciones teóricas y prácticas de los resultados obtenidos y se presentan algunas recomendaciones para trabajos futuros.

El presente documento es el resultado del trabajo desarrollado tanto en el Laboratorio de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Colombia como en los laboratorios del Centro de Investigación en Estructuras y Aplicaciones de Polisacáridos (ResPoStA por sus iniciales en inglés) perteneciente al grupo de bioquímica y química alimentaria, a cargo del profesor Manuel Antonio Coimbra de la Universidad de Aveiro en Aveiro, Portugal y del grupo de la Unidad de Biocarburantes a través de la orientación y apoyo del investigador Ignacio Ballesteros Perdices y la asesoría de María José Negro en el Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT) en Madrid, España, entre los años 2014 y 2018.

Este proyecto de investigación a su vez fue financiado por COLCIENCIAS a través de la “Beca de Doctorado Nacional convocatoria 617” y la Universidad Nacional de Colombia

con el proyecto “Estudio de pre-factibilidad técnico-económica de una biorrefinería para la producción de xilitol en Colombia a partir de la cascarilla de cebada co-producto del proceso cervecero”. Una parte de los resultados de esta investigación fue presentada como ponencia oral en la conferencia internacional EUBCE 26th *European Biomass Exhibiton & Conference* (2018) en Copenhague, Dinamarca.

1. Capítulo 1. Estado del arte

1.1 Proceso de producción de cerveza

La Figura 1-1 muestra de forma esquemática el proceso de producción de cerveza hasta la sección de cocinas; es decir, sin incluir las etapas de fermentación, maduración, dilución, filtración y embotellado. La cebada sin procesar se limpia y clasifica de acuerdo con su tamaño. Después de un período de inactividad que dura entre 4 y 6 semanas, la cebada se lleva al proceso de malteo, que comienza con una etapa controlada de germinación, en donde se incrementa el contenido de enzimas en el grano. El malteado se realiza en tres pasos: (1) remojo, (2) germinación y (3) secado u horneado (Mussatto et al., 2006).

Durante el remojo, los granos de cebada limpios se adicionan a tanques que contienen agua entre 5 y 18°C, en donde permanecen aproximadamente por dos días. El agua entra al embrión a través del micropilo para incrementar el contenido de humedad de los granos hasta un 48%. El agua de remojo se cambia cada 6 u 8 h y no se reutiliza. La hidratación del grano comienza con la germinación durante el remojo, activándose el metabolismo de la aleurona (Mussatto et al., 2006).

Después del remojo, la cebada se transporta a un tanque de germinación, en donde unos rodillos ejercen un esfuerzo cortante sobre el grano entero. Luego la cebada se mantiene en contacto con una corriente de aire húmedo que fluye a través del lecho a temperaturas entre 15 y 21°C. En la germinación se promueve la síntesis y activación de enzimas (amilasas, proteasas, β -glucanasas, etc.) en la aleurona y el endospermo amiláceo. La acción de estas enzimas modifica la estructura del endospermo amiláceo. El endospermo puede modificarse parcial o totalmente durante la etapa de germinación, que puede durar hasta 7 días. Finalmente, la cebada de malta se seca a temperaturas entre 40 y 60°C hasta reducir su humedad a 4 o 5% para evitar la contaminación microbiana y, además, generar componentes característicos de color y sabor. Después de esta etapa, la malta seca se

almacena por 3 o 4 semanas, hasta alcanzar su equilibrio u homogeneidad (Mussatto et al., 2006).

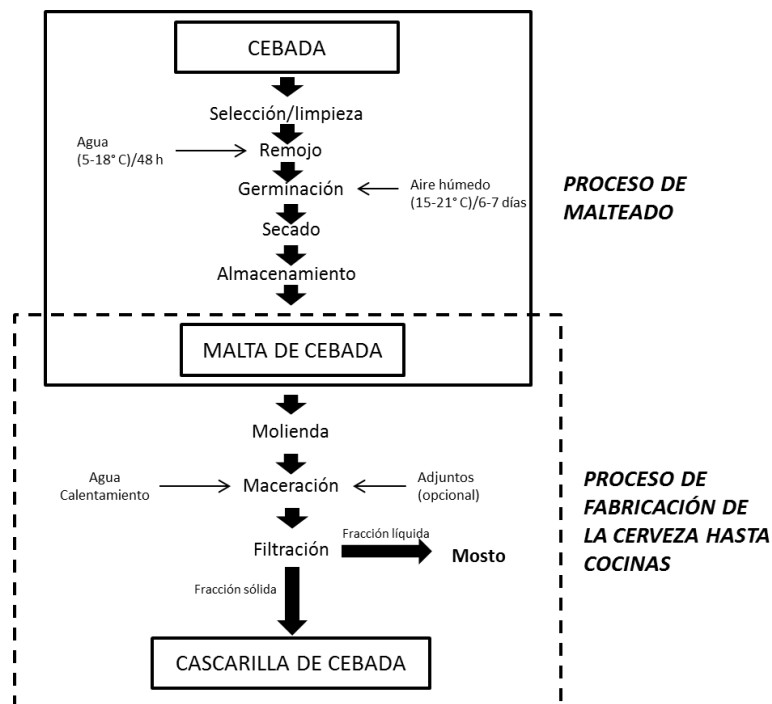


Figura 1-1. Esquema del proceso de obtención de cascarilla de cebada a partir de cebada natural

Reproducido de Journal of Cereal Science, volumen No. 43, autores: Mussatto S.I., Dragone G., Roberto I.C., Brewer's spent grain: generation, characteristics and potential applications, página 3, Copyright 2015, con permiso de Elsevier [3554871444027]

En la fabricación de cerveza, la cebada malteada se muele y se mezcla con agua en las ollas de cocción, donde adicionalmente se incrementa gradualmente la temperatura de 37 a 78°C, para promover la hidrólisis enzimática de los constituyentes de la malta en un proceso denominado maceración. Allí, tanto el almidón como los otros componentes del grano, proteínas, $(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4)$ - β -glucanos y arabinoxilanos se solubilizan como productos de degradación. Durante el proceso, el almidón se convierte a azúcares fermentables (principalmente maltosa y maltotriosa) o en azúcares no fermentables (dextrinas), mientras que las proteínas parcialmente degradadas se transforman en polipéptidos y amino ácidos. Este paso de conversión enzimática (maceración) produce un líquido dulce conocido como mosto. La porción del grano insoluble de cebada malteada

que no se degradó se deja reposar hasta formar un lecho en las ollas de cocción, que sirve como lecho filtrante para separar el mosto dulce. El mosto filtrado se evapora y enfría para luego ser usado como sustrato de fermentación en la producción de cerveza, mientras que la fracción sólida compone la cascarilla de cebada (Mussatto et al., 2006).

1.1.1 Cascarilla de cebada, co-producto del proceso cervecero

La cascarilla de cebada es el co-producto más abundante en la fabricación de cerveza. Representa alrededor del 85% (p/p) del total de los co-productos generados (Steiner et al., 2015). Este residuo, en promedio, corresponde al 31% en peso de la malta original (Townsend, 1979; citado en Mussatto et al., 2006) y presenta un contenido de humedad del 82% en peso aproximadamente.

Bavaria S.A., la mayor empresa productora de cerveza en Colombia, reportó en 2013 un total de 335.194 toneladas de residuos, de los cuales el 80,5% correspondieron al tipo orgánico (subproductos del proceso cervecero: afrecho, levadura, barreduras de malta y cereales, y germen de malta). Estos residuos se reutilizaron como materia prima, principalmente para la preparación de concentrados para animales, aprovechándose la totalidad de los mismos (Bavaria, 2013). Sin embargo, a pesar de que en el país se le da un uso industrial a esta biomasa, se está perdiendo la oportunidad de explorar y generar productos de mayor valor agregado.

La cascarilla de cebada es un material que contiene celulosa (13-21%), hemicelulosa (21-30%), lignina (12-16%) y un alto contenido de proteína (19-30%) (Senthilkumar et al., 2010; Xiros & Christakopoulos, 2012; Steiner et al., 2015), como se evidencia en la Tabla 1-1. La cascarilla de cebada tiene un valor comercial bajo, ya que usualmente se vende como biomasa para la alimentación de ganado por su alto contenido de proteína no-degradable y de vitaminas solubles en agua. Sin embargo, su composición puede variar significativamente por variables intrínsecas asociadas al ciclo de cultivo agronómico o a las diferentes condiciones a las que somete el material a nivel industrial (etapas de malteado, maceración, etc.). Debido a su variada composición, gran volumen generado y actual sub-utilización, las investigaciones científicas respecto al tema se han incrementado a lo largo de los años (Mussatto & Roberto, 2006; Aliyu & Bala, 2011; Buffington, 2014).

Tabla 1-1. Composición química* de la cascarilla de cebada de acuerdo con el origen en el periodo 2001 a 2016

País, autor y fecha(→) Componente (↓)	Japón	España	Portugal	Brasil	Bélgica	UK	Grecia	UK, Noruega		India	Alemania		Finlandia
	Kanauchi et al.	Santos et al.	Carvalho et al.	Mussato & Roberto	Celus et al.	Jay et al.	Xiros et al.	Robertson et al.		Senthil-kumar et al.	Steiner et al.		Kemppainen et al.
								Ale	Lager		Cascarilla de cebada	Cascarilla de cebada/trigo	
	2001	2003	2004	2006	2006	2008	2008	2010		2010	2015		2016
Proteínas	24	31	24,6	15,2	26,7	15-17	14,2	10-18	20-24	24,3	19-30	20-28	22,6
Lípidos	10,6	3-6	n.d.	n.d.	n.d.	6-8	13	n.d.	n.d.	5,2	10	8-18	11,4
Almidón	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1	10-12	2,7	7-13	2-8	-	4	0,6-1,0	3,1
Cenizas	2,4	4	1,2	4,6	3,3	n.d.	3,3	n.d.	n.d.	5,7	2-5	3-4	4,1
Celulosa	25,4	n.d.	21,9	16,8	0,3	31-33	12	13-21	-	13,1	12-25	35-40	13,2
Hemicelulosa	21,8	n.d.	29,6	28,4	22,5	-	40	21-27	22-29	29,9	20-25	14-16	25,3
Lignina	11,9	16	21,7	27,8	n.d.	20-22	11,5	12-16	13-17	7,12	12-28	4-7	19,6**
Fenólicos	n.d.	1,7-2	n.d.	n.d.	n.d.	1-1,5	2	0,7-1	0,7-0,9	-	-	-	-

n.d. No determinado

*Todos los valores están expresados en g por 100 g de material seco (%p/p)

**Expresado como la suma de lignina ácido insoluble (14,7%) y lignina ácido soluble (4,9%)

1.2 Generalidades de la biomasa lignocelulósica

1.2.1 Estructura de los materiales lignocelulósicos

Desde el punto de vista químico, los componentes de los materiales lignocelulósicos pueden clasificarse como materiales estructurales y extraíbles. Los primeros conforman la estructura de las paredes celulares y son los responsables de la forma de las células y de la mayoría de propiedades físicas y químicas de este tipo de biomásas. Estos incluyen los componentes poliméricos tales como la celulosa, hemicelulosa y lignina. Su remoción requiere el uso de tratamientos químicos y/o mecánicos para producir su despolimerización o su disolución parcial. Otros componentes poliméricos presentes en menor extensión y a menudo en cantidades que varían, corresponden a pectinas, almidón y proteínas (Gírio, Carvalheiro, Duarte, & Bogel-Lukasik, 2012).

Las paredes celulares presentan polímeros estructurales en su estructura que consisten de un esqueleto de microfibrillas de celulosa envueltas por moléculas de hemicelulosa que se organizan como estructuras sucesivas en forma de cinta, con la lignina ocupando los espacios vacíos entre las moléculas de hemicelulosa (Pereira, Graca, & Rodríguez, 2003).

La lignina es un polímero aromático sintetizado a partir de precursores fenilpropanoides. Las unidades químicas mayoritarias del fenilpropano presentes en la lignina son los alcoholes p-cumarílico, coniferílico y sinapílico, que están unidos por un conjunto de enlaces éster y C-C, los que a su vez forman una matriz compleja (Haghighi Mood et al., 2013). Esta fracción juega un papel importante en el fortalecimiento de las paredes celulares vegetales y en el entrecruzamiento de los polisacáridos. Por lo tanto, provee soporte a los elementos estructurales en toda la planta. Estas propiedades de la lignina, interfieren con la conversión enzimática de estos carbohidratos, deseable en los procesos industriales.

La celulosa es un polisacárido lineal de alto peso molecular compuesto de largas cadenas de moléculas de D-glucosa unidas por enlaces beta-(1-4) que, a la vez, se agrupan en estructuras superiores de gran cristalinidad. La celulosa cristalina puede representar aproximadamente del 50 al 90% del total de la celulosa (Foyle, Jennings, & Mulcahy, 2007), lo que hace difícil su hidrólisis y conversión a azúcares fermentables. Sin embargo, una vez se producen los azúcares simples, pueden fermentarse sin dificultad.

La hemicelulosa es un polímero heterogéneo conformado por pentosas (β -D-xilosa, α -L-arabinosa), hexosas (β -D-manosa, β -D-glucosa, α -D-galactosa) y/o ácidos urónicos. Otros azúcares minoritarios como la α -L-ramnosa y α -L-fucosa también podrían estar presentes en pequeñas cantidades y los grupos hidroxilo de los azúcares pueden estar parcialmente acetilados. La hemicelulosa forma puentes de hidrógeno con las microfibrillas de la celulosa, incrementando la estabilidad de la matriz lignocelulósica (Foyle et al., 2007). Debido a que la hemicelulosa es una cadena corta de hetero-polisacáridos ramificados, es mucho más fácil de hidrolizar a sus azúcares constituyentes que la celulosa, tanto por su estructura como por su composición (Houghton, Weatherwas, & Ferrel, 2005). Las hemicelulosas son relativamente sensibles a las condiciones de operación y, por lo tanto, variables como la temperatura y tiempo de residencia deben controlarse para evitar la formación de sub-productos no deseados tales como furfural e hidroximetilfurfural, los que posteriormente podrían inhibir los procesos de fermentación (Haghighi Mood et al., 2013).

La hemicelulosa es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza después de la celulosa. En general, representa del 20 al 35% de la biomasa lignocelulósica (Saha, 2003). Las hemicelulosas usualmente se clasifican de acuerdo con los residuos de azúcares que principalmente conforman la columna vertebral de la estructura del polímero. El xilano, es el polímero más abundante en la hemicelulosa de cereales y maderas duras. Está compuesto por unidades de D-xilosa unidas por enlaces β -1,4 en la columna principal que pueden ser sustituidas por diferentes grupos, como D-galactosa, L-arabinosa, ácido glucurónico y residuos acetilos, ferúlicos y p-cumarílicos. Las otras dos mayores hemicelulosas que se presentan en las paredes celulares vegetales corresponden a los galacto(gluco)mananos, columnas vertebrales de D-manosa (mananosa) y D-glucosa (glucomananos) unidas por enlaces β -1,4 con residuos de D-galactosa como cadenas laterales, y xiloglucanos, columnas vertebrales de D-glucosa unidas por enlaces β -1,4 sustituidas por D-xilosa. Además, en el polímero de xiloglucanos, los residuos de L-arabinosa y D-galactosa pueden unirse a los residuos de xilosa, y la L-glucosa puede unirse a los residuos de galactosa. La diversidad de uniones de los grupos laterales a la columna vertebral de los xiloglucanos le confiere a este polímero una alta complejidad estructural y variabilidad. En la Figura 1-2, se observa una representación esquemática de los tres mayores tipos de hemicelulosas que pueden existir en la naturaleza.

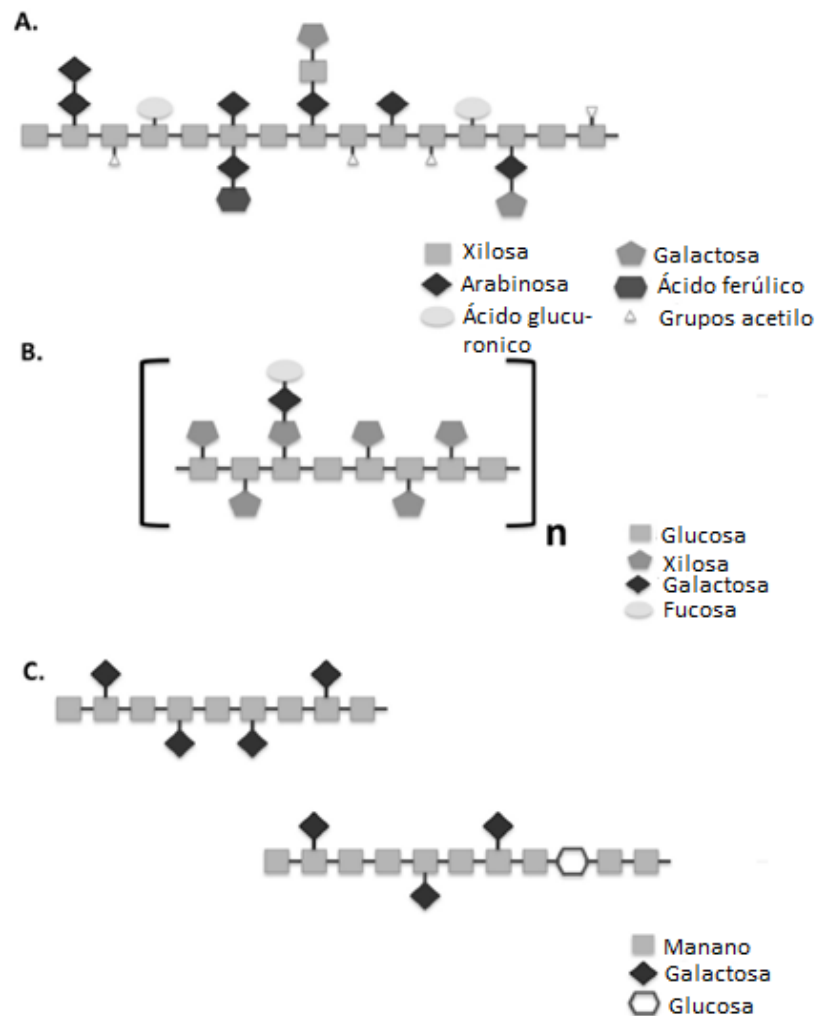


Figura 1-2. Representación esquemática de las estructuras de los tres principales tipos de hemicelulosas. A. Xilano, B. Xiloglucano, C. Galactomanano

Wagner Rodrigo de Souza (2013). Microbial Degradation of Lignocellulosic Biomass, Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization, Dr. Anuj Chandel (Ed.), ISBN: 978-953-51-1119-1, InTech, DOI: 10.5772/54325. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/sustainable-degradation-of-lignocellulosic-biomass-techniques-applications-and-commercialization/microbial-degradation-of-lignocellulosic-biomass>
 © 2013 de Souza WR. Published in [short citation] under CC BY 3.0 license. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.5772/54325>

Finalmente, la pared celular contiene proteínas estructurales y no-estructurales. Las proteínas estructurales en la pared celular pueden clasificarse como glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs), proteínas ricas en glicina (GRPs), proteínas ricas en prolina (PRPs) y proteínas ricas en arabinogalactanos (AGPs). Los nombres de las diferentes clases de proteínas reflejan la abundancia de ciertos aminoácidos. En el caso de las AGPs están glicosiladas. Las proteínas no estructurales incluyen una gran variedad de enzimas

que participan en la biosíntesis o reordenamiento de los polímeros de la pared celular, tales como peroxidasas, hidrolasas y transferasas (Vermerris, 2008).

La cebada contiene entre 10 y 12% de proteínas (base seca) las cuales pueden ser clasificadas por su extractibilidad secuencial. La fracción de las hordeínas extraídas en un medio con alcohol y en presencia de un agente reductor, es del 35 al 55% de las proteínas del grano de cebada y estas a su vez son la principal proteína de almacenamiento de la cebada. Las hordeínas de la cebada se dividen en cinco grupos basados en sus movilidades electroforéticas y la composición de sus aminoácidos: las hordeínas B y C (70-80% y 10-20% de la fracción de hordeínas, respectivamente) y las hordeínas D y γ (menos del 5% de la fracción de hordeínas) (Celus, Brijs, & Delcour, 2006; Kotlar et al., 2013).

La principal función de las proteínas de almacenamiento en los granos de cereales es actuar como reserva de nitrógeno. Durante la germinación, estas proteínas son movilizadas por enzimas hidrolíticas y los péptidos y aminoácidos resultantes se utilizan para el crecimiento de las plántulas en desarrollo. Las proteínas de almacenamiento en los granos de cebada pertenecen a dos clases según su grado de solubilidad: globulinas (una fracción soluble en soluciones de sal diluida) y prolaminas (una fracción soluble en alcoholes acuosos). Estas fracciones se obtienen usando un procedimiento de extracción secuencial establecido por Osborne (Osborne 1895; citado en Holopainen-Mantila, 2015). Debido a las sales presentes en el grano de cebada maduro, las albúminas solubles en agua no se contabilizan como proteínas de almacenamiento ya que se extraen como globulinas (Holopainen-Mantila, 2015).

Las globulinas representan del 10 al 20% del contenido total de las proteínas de los granos de cebada. No todas las globulinas sirven como proteínas de almacenamiento, ya que algunas tienen funciones metabólicas y protectoras. La β -amilasa es una excepción, ya que actúa almacenando nitrógeno durante el desarrollo del grano y se emplea posteriormente como enzima para hidrolizar el almidón durante la germinación. Las globulinas que juegan un papel de proteínas de almacenamiento se localizan principalmente en las células del aleurona, pero también en el embrión (Holopainen-Mantila, 2015).

Las prolaminas presentes en los granos de cebada se llaman hordeínas, y se localizan solo en las células del endospermo amiláceo (Yupsanis, Burguess, Jackson, & Shewry, 1990; Holopainen-Mantila, 2015). Las hordeínas se diferencian clásicamente por su movilidad en electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio y poliacrilamida (SDS-PAGE). Las hordeínas D tienen el mayor peso molecular (105 kDa) seguido de las C (55-75 kDa), B y γ (32-46) kDa, y hordeínas de bajo peso molecular (LMW) o similares a avenina (22 y 16,5 kDa). La composición polipeptídica de cada grupo de hordeína varía con el cultivo (Holopainen-Mantila, 2015). Los altos contenidos de glutamina y prolina son característicos de los hordeínas (Tabla 1-2).

Tabla 1-2. Composición de los aminoácidos de las hordeínas totales y su fracción en porcentaje mol. Los datos se basan en secuencias de longitud completa, a excepción de las hordeínas LMW (Holopainen-Mantila, 2015)

Amino ácido	B1	C	D	γ_1	LMW ⁷
Alanina (A)	2,5	0,7	3,2	2,1	7,2
Arginina (R)	2,6	1,0	1,6	1,4	2,5
Asparagina (N)	0,7	1,0	0,9	1,7	2,2
Ácido aspártico (D)	0,0	0,0	0,6	0,7	2,2
Cisteína (C)	2,9	0,0	1,5	3,5	7,1
Glutamina (Q)	30,3	37,2	25,8	28,0	26,2
Ácido glutámico (E)	1,8	1,4	2,2	2,1	26,2
Glicina (G)	2,9	0,3	15,7	3,1	6,0
Histidina (H)	1,4	1,0	3,1	1,4	0,2
Isoleucina (I)	4,4	3,4	0,7	3,8	3,3
Leucina (L)	8,0	4,1	4,1	7,0	4,0
Lisina (K)	0,7	0,0	1,2	1,7	0,1
Metionina (M)	1,1	0,3	0,4	2,1	3,6
Fenilalanina (F)	4,7	7,9	1,3	5,6	2,1
Prolina (P)	19,3	30,0	10,5	16,8	7,0
Serina (S)	4,7	4,1	10,5	5,6	12,2
Treonina (T)	2,2	1,4	7,3	3,1	9,6
Triptofano (W)	0,7	1,4	1,2	0,7	-
Tirosina (Y)	2,5	3,1	4,2	2,1	2,3
Valina (V)	6,2	1,4	4,1	7,3	4,4

⁷ LMW subunidad de 16,5 kDa

Las hordeínas también son pobres en lisina, lo que reduce su valor nutricional. Cada grupo de hordeína tiene una composición de aminoácidos característica, que está fuertemente influenciada por las secuencias repetitivas de aminoácidos los cuales cubren entre 30-100% de estos polipéptidos. Típicamente, la hordeína C contiene más fenil-alanina que las otras hordeínas. Las hordeínas D y LMW contienen menos prolina en comparación con otros grupos de hordeínas. Como compensación, estas hordeínas son ricas en glicina, serina y treonina (Holopainen-Mantila, 2015).

Los heteroxilanos, los cuales pueden estar altamente reticulados por puentes diferúlicos, constituyen una red en la cual las microfibrillas de la celulosa pueden estar embebidas. Las proteínas estructurales presentes en la pared celular podrían estar unidas reticuladamente por puentes de isoditirosina y con heteroxilanos ferulosilados, formando así una red insoluble (Saha, 2003). En los heteroxilanos suaves, los residuos de arabinofuranosilos se esterifican con los ácidos p-cumáricos y ferúlicos (Figura 1-3).

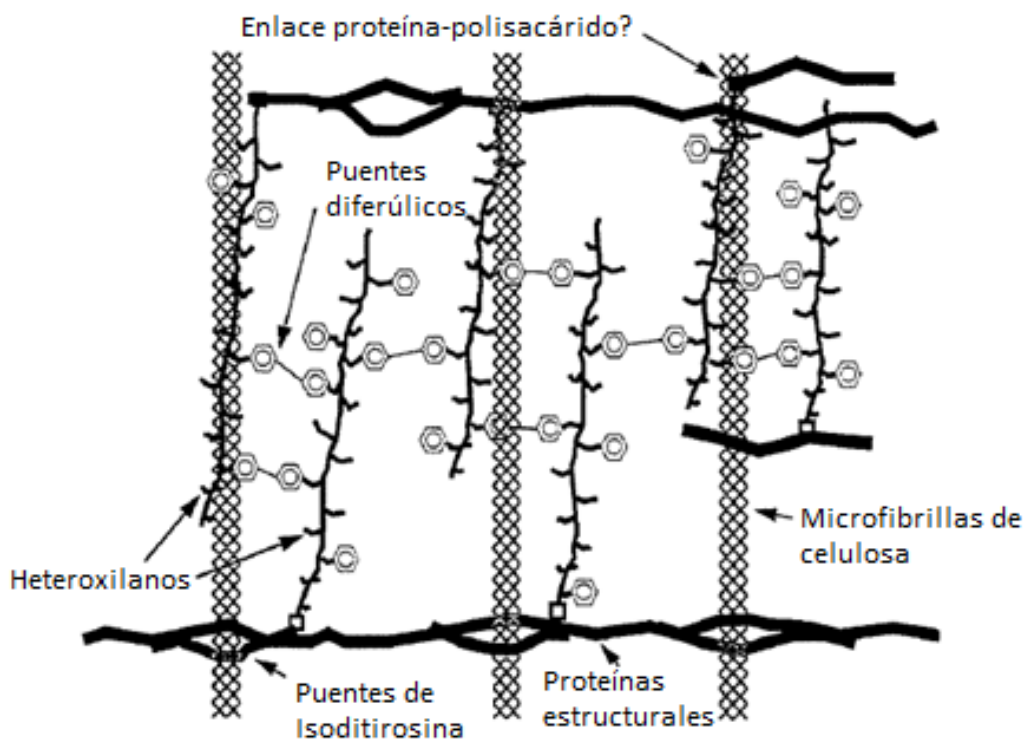


Figura 1-3. Modelo de la pared celular de fibras de maíz

Reproducido de Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, volumen No. 30(5), autores: Badal C. Saha, Hemicellulose bioconversion, página 280, Copyright 2015, con permiso de Springer [3699010041491]

1.3 Enzimas involucradas en la hidrólisis de la hemicelulosa (tipo arabinoxilano)

El principal tipo de hemicelulosa presente en los cereales es el xilano, aunque puede contener pequeñas cantidades de glucomananos. En la cascarilla de cebada se ha reportado la composición de la hemicelulosa (Garrote, Domínguez, & Parajó, 1999; Carvalheiro, Duarte, Medeiros, & Gírio, 2004; Gírio et al., 2012) que se muestra la Tabla 1-3.

Tabla 1-3. Composición de la hemicelulosa de la cascarilla de cebada

Componente	g/100 g de material seco
Xilosa	15-23,4
Arabinosa	8-10,2
Manosa	0
Galactosa	1
Ramnosa	0
Ácidos urónicos	2
Grupos acetilo	0,8-1,1

La hidrólisis completa de los arabinoxilanos requieren tanto de la despolimerización como de las actividades enzimáticas laterales que actúan sinérgicamente en la estructura hemicelulósica hasta alcanzar un grado de hidrólisis tal que libere los azúcares simples: arabinosa y xilosa. En el estudio realizado por Xiros, Katapodis, & Christakopoulos (2011), se reportó la acción sinérgica entre las endo-1,4- β -xilanasas (EC 3.2.1.8), β -xilosidasas (EC 3.2.1.37) y α -L-arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55). La hidrólisis enzimática de la hemicelulosa es un método promisorio para romper los enlaces de la hemicelulosa y así obtener azúcares fermentables sin incrementar la concentración de ningún compuesto inhibitorio en el hidrolizado. El esquema de reacción coordinado entre las enzimas tipo xilanasas se muestra en la Figura 1-4.

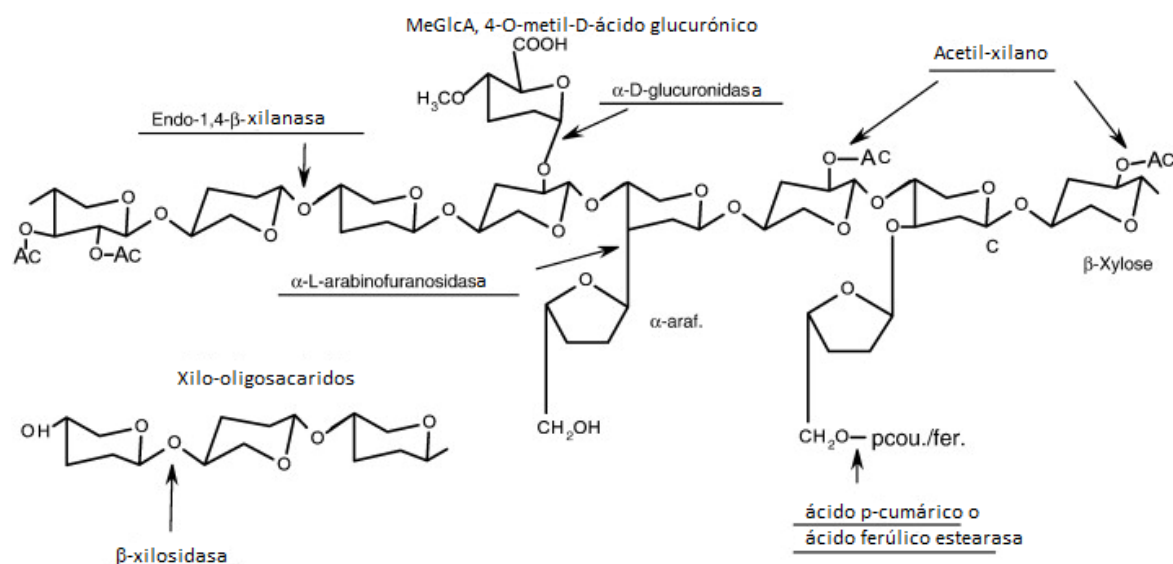


Figura 1-4. Representación esquemática de la acción coordinada de hemicelulasas sobre los enlaces de la hemicelulosa hasta compuestos monoméricos.

Reproducido de Food Research International, autores: Ana Flávia Azevedo Carvalho, Pedro de Oliva Neto, Douglas Fernandes da Silva, Gláucia Maria Pastore, Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis, página 75-85, Copyright 2018, con permiso de Elsevier [4338360634974]

Por lo tanto, la producción de azúcares a partir de la fracción hemicelulósica de un hidrolizado proveniente de cascarilla de cebada, puede describirse generalmente mediante la siguiente secuencia de reacciones:

- (1) Arabinoxilanos → xilo-oligosacaridos no sustituidos o ramificados (xilanasas)
- (2) Xilo-oligosacaridos → xilobiosa, xilosa (xilanasas)
- (3) Arabinoxilano o arabino-xilo-oligosacáridos → arabinosa (arabinofuranosidasas)
- (4) Xilobiosa o pequeños xilo-oligosacáridos → xilosa (xilosidasas)

La biodegradación total del xilano requiere no solo de enzimas tipo endo-β-1,4-xilanasas, β-xilosidasas sino también de muchas enzimas denominadas “accesorio”, tales como la α-L-arabinofuranosidasas, α-glucuronidasas, acetilxilano estearasa, ácido ferúlico estearasa y ácido p-cumárico estearasa, las cuales son necesarias para hidrolizar los diferentes sustitutos del xilano (Saha, 2003). En la Tabla 1-4 se resumen las múltiples enzimas involucradas en la degradación del xilano y sus modos de acción.

Tabla 1-4. Enzimas involucradas en la hidrólisis del complejo heteroarabinoxilano

Enzima	Modo de acción
Endo-xilanasa	Hidroliza principalmente los enlaces interiores β -1-4-xilosa de la columna vertebral de xilanos
Exo-xilanasa	Hidroliza los enlaces β -1-4-xilosa liberando xilobiosa
β -xilosidasa	Libera xilosa de la xilobiosa y xilo-oligosacáridos de cadena corta
α -arabinofuranosidasa	Hidroliza los enlaces α -arabinofuranosos terminales no-reductores de los arabinoxilanos
α -glucuronidasa	Libera el ácido glucurónico de los glucuronoxilanos
Acetilxilano estearasa	Hidroliza los enlaces acetil ésteres en xilanos acetilados
Ácido ferúlico estearasa	Hidroliza los enlaces ésteres ferúlicos en xilanos
Ácido p-cumárico estearasa	Hidroliza los enlaces p-cumaril ésteres en xilanos

Reproducido de Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, autores: Badal C. Saha, Hemicellulose bioconversion, página 282, Copyright 2015, con permiso de Springer [3704960685676]

Muchos microorganismos, tales como *Penicillium capsulatum* y *Talaromyces emersonii*, tienen el sistema enzimático completo de degradación del xilano. De otro lado, muchas enzimas accesorio solamente remueven las cadenas laterales de los xilo-oligosacáridos. Estas enzimas requieren una hidrólisis parcial del xilano antes de que estas cadenas puedan romperse. Aunque la estructura del xilano es más compleja que la de la celulosa y requiere muchas enzimas diferentes con diversos grados de especificidad para una hidrólisis completa, este tipo de polisacáridos no forman estructuras cristalinas compactas como la celulosa y de esta manera son más accesibles a la hidrólisis enzimática (Gilbert & Hazlewood, 1993).

Sin embargo, por ahora, toda la evidencia sugiere que para procesos en los que desea lograrse una degradación enzimática intensiva de los arabinoxilanos, es necesario que todas las enzimas actúen sinérgicamente (Lagaert, Pollet, Courtin, & Volckaert, 2014).

- **Despolimerización de glucuronoxilanos extraídos en álcali por xilanasas**

Para sacarificar un glucuronoxilano promedio de maderas duras extraído con álcali, se puede lograr la despolimerización por medio de tres tipos de endo- β -1,4-xilanasas que se

han clasificado en hidrolasas glucosídicas (GH) de las familias 10, 11 y 30 (Figura 1-5). El modo de acción de las enzimas GH difiere principalmente en la forma en que estas aceptan y reconocen los residuos de MeGlcA en el proceso de formación de los complejos productivos enzima-sustrato. Con excepción del extremo reductor, las xilanasas GH10 requieren dos unidades consecutivas de residuos Xylp no sustituidos para atacar la cadena principal del xilano, y a su vez son capaces de romper el enlace glucosídico Xylp sustituido con el residuo MeGlcA. Mientras que las xilanasas GH11 requieren tres residuos Xylp no sustituidos en fila y un enlace antes del Xylp sustituido con MeGlcA, para atacar la cadena principal de xilano. De otra parte, los xilo-oligosacáridos neutros lineales, principalmente Xyl₂ y Xyl₃, tienen que ser hidrolizados a sus monómeros por acción de la β -xilosidasa, el segundo tipo de enzima que ataca el enlace β -1,4-xilosídico. Esta enzima libera xilosa del extremo no reductor de los xilo-oligosacáridos y puede acortar el ácido aldopentaurónico MeGlcA³Xyl₄ al ácido aldotetraurónico MeGlcA³Xyl₃ (Biely, Singh, & Puchart, 2016).

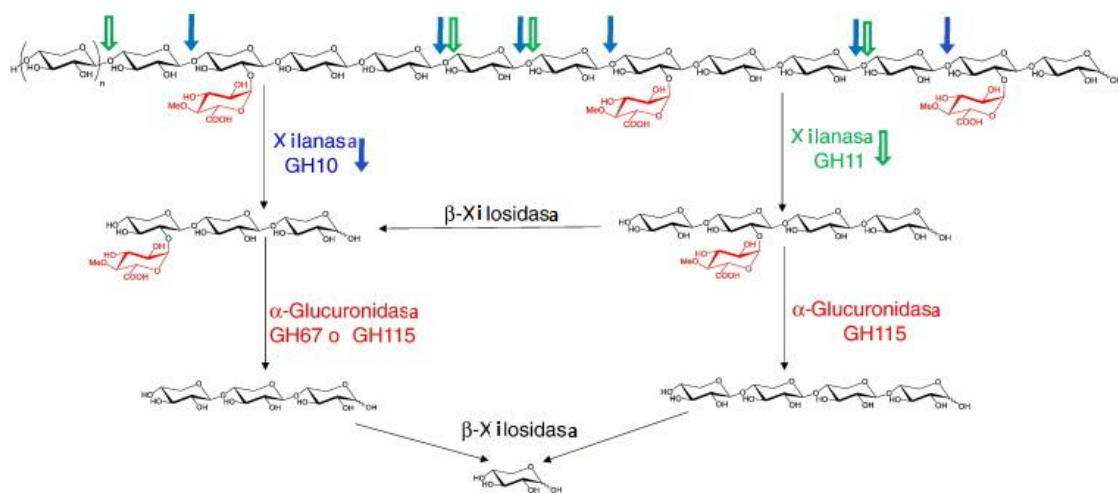


Figura 1-5. Esquema de la hidrólisis enzimática de glucuronoxilanos extraídos alcalinamente, por xilanasas GH de la familia 10 y 11. Las enzimas generan fragmentos neutros y ácidos. Solamente se muestran los oligosacáridos ácidos, ácidos aldourónicos y su hidrólisis a monosacáridos por la acción de la β -xilosidasa y α -glucuronidasas de la familia GH67 y GH115.

Reproducido de Biotechnology Advances, autores: Peter Biely, Suren Singh, Vladimír Puchart, Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art, página 1260-1274, Copyright 2018, con permiso de Elsevier [4338360306664]

El tercer tipo de enzimas que intervienen en la degradación se conocen como α -glucuronidasas. La α -glucuronidasa de la familia GH67 puede liberar MeGlcA del oligosacárido que lleva el ácido urónico en el extremo no reductor del residuo de Xylp, mientras que la α -glucuronidasa de la familia GH115 libera el MeGlcA de los residuos internos de Xylp en los oligo y polisacáridos (Biely et al., 2016).

Por otra parte, de acuerdo con la especificidad posicional y los requerimientos de los grupos hidroxilos libres vecinos sobre el residuo de Xylp, las α -L-arabinofuranosidasas pueden dividirse en dos grupos (Figura 1-6).

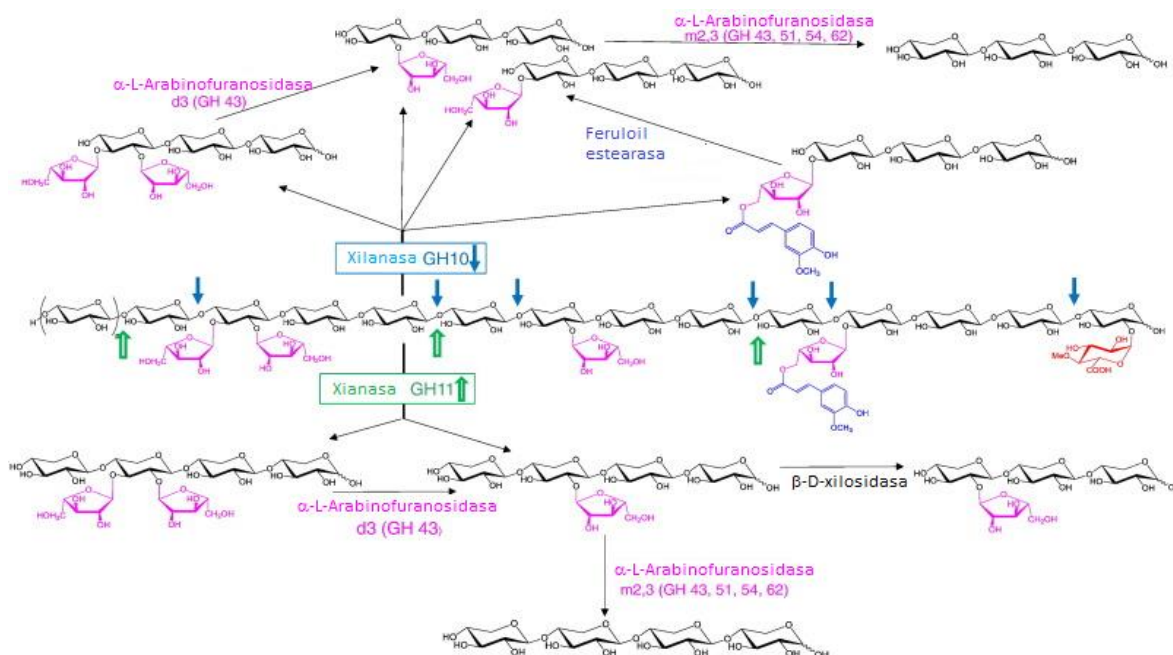


Figura 1-6. Esquema de la hidrólisis enzimática de glucuronoxilanos extraídos alcalinamente por xilanasas GH de la familia 10 y 11. Solo se muestran fragmentos arabinosilados. Su hidrólisis a monosacáridos requiere de la acción de dos tipos de α -L-arabinofuranosidasas y β -xilosidasas. Las α -L-arabinofuranosidasas son típicamente activas en la posición 2 o 3 de los residuos de Xylp monoarabinosilados (enzimas tipo m2,3 de las familias GH43, GH51, GH54 y GH62) o sobre residuos Xylp doblemente sustituidos (enzimas tipo d2,3, algunos miembros de la familia GH43 y un miembro de la familia GH51), las cuales a su vez liberan solamente la Araf de la posición 3.

Reproducido de Biotechnology Advances, autores: Peter Biely, Suren Singh, Vladimír Puchart, Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art, página 1260-1274, Copyright 2018, con permiso de Elsevier [4338360306664]

El mayor grupo está formado por las enzimas activas sobre los residuos de Xylp monosustituidos por Araf tanto en la posición 2 como 3. Ellas están definidas como m2,3 α -L-arabinofuranosidasas y pueden ser de las familias GH 43, 51, 54 y 62, el menor grupo incluye enzimas denominadas como d3 α -L-arabinofuranosidasas, las cuales son específicas para residuos de Xylp doblemente arabinosilados, del cual ellas liberan selectivamente solo la Araf unida a la posición α -1,3, dejando la Araf del enlace α -1,2 unida a la cadena principal. Estas enzimas están ejemplificadas por la familia de α -L-arabinofuranosidasas GH43 de *Bifidobacterium adolescentis* y *Humicola insolens*.

1.4 Proceso de fabricación de productos de valor agregado a partir de biomasa lignocelulósica

El proceso de fraccionamiento de la biomasa lignocelulósica hasta productos de valor agregado incluye, de manera general, tres etapas básicas: pre-tratamiento, hidrólisis y fermentación. El pre-tratamiento tiene como objetivo reducir la cristalinidad de la celulosa y dissociar el complejo celulosa-lignina, aumentando a su vez el área superficial del material. Para que este pre-tratamiento sea eficaz debe reunir ciertas características como un bajo consumo de energía, uso de reactivos de bajo precio y mínima generación de inhibidores de fermentación, entre otras. Las opciones de pre-tratamiento son muchas y variadas.

Los pre-tratamientos, pueden clasificarse en cuatro grandes grupos: físicos, químicos, fisicoquímicos y biológicos (Haghighi Mood et al., 2013) e incluso las múltiples opciones de combinación entre ellos. Los pre-tratamientos físicos incluyen molienda, extrusión, uso de microondas o congelamiento; los químicos incluyen el uso de ácidos, álcalis, líquidos iónicos, organosolventes u ozonólisis; y entre los físico-químicos se encuentran explosión con vapor, explosión de fibra con amonio "AFEX", explosión con CO₂, agua caliente u oxidación húmeda (Haghighi Mood et al., 2013).

Si el material lignocelulósico presenta altos contenidos de proteína, pueden incluirse etapas previas o simultáneas de extracción de la proteína. En la Figura 1-7 se presenta un esquema que ilustra las diferentes técnicas de extracción y fraccionamiento de las proteínas y los péptidos. Las principales técnicas de extracción y fraccionamiento de proteínas corresponden a los métodos de disrupción celular, como la homogenización mecánica, ultrasonificación, de presión, tratamientos con temperatura y lisis osmótica o

química. La solubilización/precipitación de las proteínas puede lograrse a través de solventes orgánicos, soluciones acuosas, extracción enzimática acuosa y agua subcrítica.

La extracción con enzimas en un medio acuoso se define como una técnica ambientalmente amigable, segura y una alternativa relativamente económica que, de manera simultánea, permite la extracción tanto de aceites como de proteínas. Sin embargo, aunque el proceso de extracción enzimático no produce tóxicos, presenta algunas desventajas, tales como tiempos largos de reacción y alto costo de las enzimas que hacen esta estrategia antieconómica. El uso de enzimas inmovilizadas en la extracción de proteínas podría reducir el costo total, permitiendo la re-utilización de las enzimas (Martínez-Maqueda, Hernández-Ledesma, Amigo, Miralles, & Gómez-Rueda, 2013).

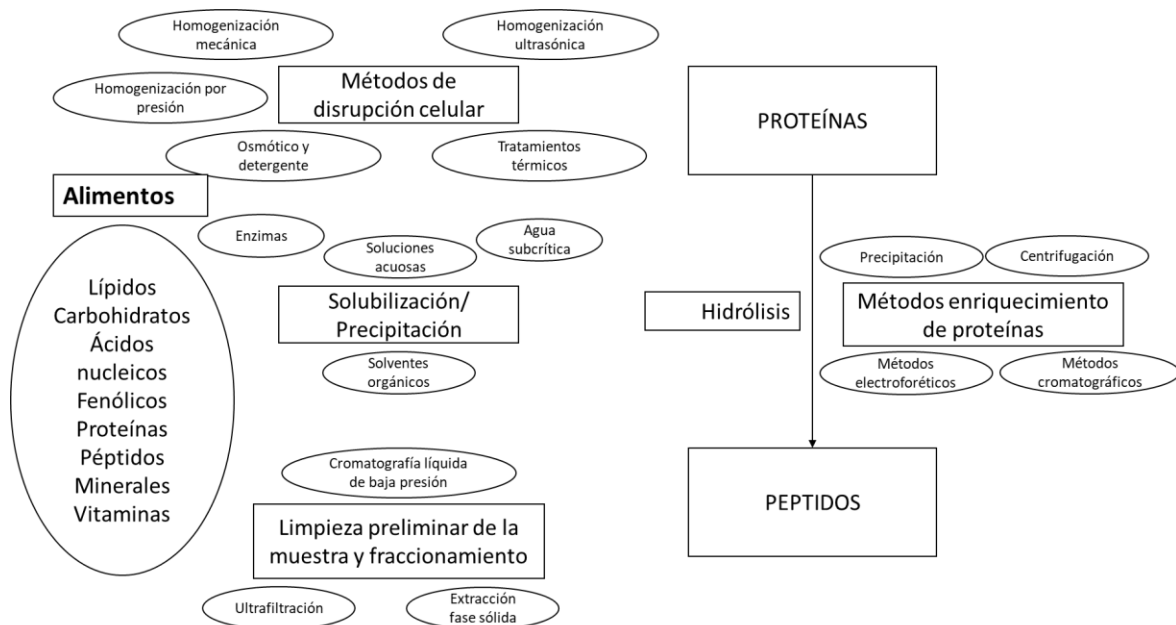


Figura 1-7. Esquema que ilustra las técnicas de extracción y fraccionamiento integradas para proteínas y péptidos empleados en proteómica en alimentos

Reproducido de Springer eBook, autores: Daniel Martínez-Maqueda, Blanca Hernández-Ledesma, Lourdes Amigo et al, Extraction/Fractionation Techniques for Proteins and Peptides and Protein Digestion, página 22, Copyright 2018, con permiso de Springer Nature [4338361289046]

Después de que se logra disociar el complejo lignocelulolítico y se han extraído las proteínas debe realizarse una etapa de hidrólisis para fraccionar los polisacáridos de la hemicelulosa y celulosa, y así obtener azúcares. Existen dos tecnologías de acuerdo con

el tipo de catalizador empleado: hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática. La primera es una opción viable por el bajo costo de los ácidos, pero presenta desventajas ambientales y energéticas, por las altas temperaturas necesarias (160-230°C) (Kumar, Barrett, Delwiche, & Stroeve, 2009) y la generación de inhibidores que afectan la posterior etapa de fermentación, haciendo necesario incluir una etapa de detoxificación en el proceso. La segunda puede lograrse con la adición de enzimas. Por ejemplo, la celulosa puede hidrolizarse con celulasas obtenidas a partir de hongos o bacterias y la hemicelulosa puede hidrolizarse a azúcares monoméricos por la acción de diferentes enzimas. El costo de las enzimas empleadas y el tiempo son los parámetros más relevantes en esta opción de proceso.

Finalmente, la fermentación es el área fundamental y más madura de la biotecnología para la transformación biológica. Durante siglos, la fermentación se utilizó para conservar y procesar alimentos y bebidas. Solo en las últimas décadas debido a los avances en biotecnología, la fermentación se ha utilizado para llevar al mercado una gran variedad de productos, incluidos los productos químicos plataforma, combustibles renovables, biopolímeros, antibióticos, aminoácidos, ácidos orgánicos y productos farmacéuticos usando una variedad de materias primas agroindustriales. Algunos productos químicos comerciales a granel, como el etanol, ácido láctico, ácido cítrico, acetona y butanol, se producen vía procesos de fermentación a través de levaduras, hongos y bacterias (Kaur et al., 2014).

1.4.1 Desarrollos y avances en pre-tratamientos sobre la cascarilla de cebada, énfasis pre-tratamiento alcalino y explosión con vapor

- **Pre-tratamiento alcalino**

El pre-tratamiento alcalino ha sido un pre-tratamiento evaluado a lo largo de los años sobre diferentes biomásas lignocelulósicas. Dentro de los reactivos alcalinos que se emplean frecuentemente se destacan los hidróxidos de sodio, potasio, calcio, amonio, bario y litio. El pre-tratamiento con NaOH es el método más común en la conversión de los materiales lignocelulósicos, seguido por el uso de cal. La razón principal son sus ventajas en cuanto a costo y seguridad, así como a su posible recuperación después del pre-tratamiento como

sales. Por ejemplo, una de las formas de recuperación más fáciles incluye la reacción del NaOH con dióxido de carbono hasta carbonato de sodio insoluble (Xu & Sun, 2016).

La eficiencia de la hidrólisis alcalina depende del tipo de sustrato evaluado y de las condiciones del pre-tratamiento, aunque es más efectivo para aquellas biomásas que presentan un contenido de lignina bajo como los residuos agroindustriales (Xu & Sun, 2016). El NaOH incrementa el área superficial de la celulosa, reduciendo el grado de polimerización y la cristalinidad, alterando a su vez la estructura de la lignina. Por otro lado logra la solubilización de la fracción de hemicelulosa y la extracción de las proteínas presentes (Sari, Mulder, Sanders, & Bruins, 2015), lo cual genera dos corrientes de proceso: una líquida y una sólida “WIS” (*Water Insoluble Solids* por sus iniciales en inglés). De la primera corriente puede recuperarse la fracción de la hemicelulosa solubilizada (después de una precipitación selectiva) (Mandalari et al., 2005; Vieira et al., 2014) e inclusive la lignina degradada (como compuestos fenólicos principalmente) (Kaur et al., 2014), mientras que de los WIS podría recuperarse, principalmente la celulosa. Este fraccionamiento de la biomasa pre-tratada alcalinamente supone una estrategia dentro del concepto de diseño de procesos, específicamente en la aplicación de una biorrefinería, la cual a su vez podría convertirse en una alternativa prometedora a explorar desde el punto de vista económico.

Durante el pre-tratamiento alcalino las primeras reacciones que ocurren corresponden a la solvatación y saponificación, las cuales conducen a un estado de hinchamiento de la biomasa, haciéndola más accesible, posteriormente, a las enzimas y microorganismos. A concentraciones fuertes de álcali, ocurre una disolución por la “descamación” de los grupos finales, donde puede ocurrir la hidrólisis alcalina, degradación y descomposición de los polisacáridos disueltos. La hidrólisis alcalina implica la saponificación de los enlaces ésteres intramoleculares reticulados con el xilano de la hemicelulosa y otros componentes, incrementándose la porosidad de la biomasa lignocelulósica con la desintegración de la reticulación (Ortíz & Quintero, 2014).

La liberación de la lignina de la pared celular está principalmente relacionada con las reacciones de hidrólisis. El álcali remueve los grupos acetilo y también es efectivo en remover las sustituciones urónicas de la hemicelulosa, de este modo reduce el impedimento estérico de las enzimas hidrolíticas y mejora la digestibilidad de los carbohidratos. Por otra parte, los tratamientos alcalinos mejoran el carácter poli-iónico de

la lignocelulosa pre-tratada, lo que está relacionado con la difusión de los iones básicos dentro de la biomasa. Estos iones permanecen dentro del material y actúan como una contra carga de los iones carboxilatos. Este carácter poli-iónico del material pre-tratado es el que promueve el hinchamiento (Xu & Sun, 2016).

Usualmente, el pre-tratamiento alcalino es llevado a cabo a bajas temperaturas y presiones, y puede completarse inclusive a condiciones atmosféricas. Normalmente genera menos degradación de los azúcares en comparación con los tratamientos ácidos. El principal inconveniente del proceso es el tiempo; este puede tomar horas o incluso días para completar la reacción. La temperatura también es un factor importante que influye en el desarrollo del pre-tratamiento alcalino. Por ejemplo, el tiempo de reacción podría reducirse a través del incremento de la temperatura. El pre-tratamiento alcalino puede llevarse a cabo a temperatura ambiente durante unos pocos segundos o inclusive hasta varios días (Xu & Sun, 2016).

El pre-tratamiento alcalino puede ser clasificado en condiciones de proceso severas y moderadas. En las condiciones severas, la concentración del NaOH es baja (0,5-4%), pero se usan altas presiones y temperaturas, y usualmente el reciclaje del NaOH no es posible. Este mecanismo está principalmente adscrito a la destrucción reactiva y solubilización de la hemicelulosa y la lignina. Sin embargo, a condiciones moderadas, se aplican altas concentraciones de NaOH (6-20%) a temperaturas bajas y presiones ambiente (por ejemplo, 0°C). La disolución de la hemicelulosa a estas condiciones es el principal fenómeno. La disolución necesita una alta concentración del NaOH (al menos 6 a 8%, dependiendo de la temperatura). El proceso que emplea altas concentraciones de hidróxido de sodio no remueve mucha lignina, pero la solución de NaOH puede reusarse, aunque este pre-tratamiento resulta no ser muy efectivo sobre maderas blandas. (Xu & Sun, 2016).

Dentro de los pre-tratamientos evaluados hasta el momento para degradar la estructura lignocelulósica de la cascarilla de cebada, se destacan en primera instancia los tratamientos químicos. Mussatto et al. (2008), emplearon un proceso de pre-tratamiento en dos etapas: primero usaron ácido sulfúrico diluido y posteriormente una solución de hidróxido de sodio para separar las fracciones de hemicelulosa y lignina, dejando disponible la celulosa, la cual posteriormente hidrolizaron con enzimas comerciales. Dichos

autores reportan que las mejores condiciones de hidrólisis fueron 100 rpm, 45 FPU/g y 2% p/v de carga de sustrato, con lo cual obtuvieron un rendimiento de 93,1% de glucosa. En el mismo año Xiros, Topakas, Katapodis, & Christakopoulos (2008) evaluaron la deslignificación sobre cascarilla de cebada a través del pre-tratamiento químico con una solución de hidróxido de sodio en relación 8:1 líquido a sólido a diferentes concentraciones (121°C por 30 min). Concluyeron que la hidrólisis enzimática del material pre-tratado con el álcali se incrementó en 50% comparado con el material sin pre-tratamiento.

Recientemente, Marcolongo et al. (2014), reportaron la efectividad para mejorar la hidrólisis enzimática de tres tipos de biomásas tales como *Arundo donax*, tuzas de maíz y cascarilla de cebada, a través del suplemento de enzimas secundarias como por ejemplo, las arabinofuranosidasas producidas a partir del hongo *Pleurotus ostreatus* y de la misma enzima recombinante expresada en *Pichia pastoris*. Todos los residuos se pre-trataron químicamente en una solución alcalina de amoníaco y *A. donax* se le realizó adicionalmente la combinación con el pre-tratamiento de explosión con vapor. Los pre-tratamientos lograron reducir el contenido original de lignina en las tres biomásas estudiadas y la adición de estas enzimas accesorio tipo hemicelulasas recombinantes logró incrementar la recuperación de xilosa hasta un porcentaje de 56,4%.

Wilkinson, Smart, & Cook (2014), optimizaron el pre-tratamiento alcalino para evaluar el potencial de la producción de bioetanol a partir de la cascarilla de cebada, empleando dos tipos de químicos, el primero fue peróxido alcalino (5% H_2O_2 /NaOH a pH 11) en una relación de 25% p/v de carga de sólidos, por 5 h a 100°C. Alcanzaron hasta 87% del rendimiento teórico de glucosa (basados en la composición del residuo pre-tratado), mientras que con NaOH al 5%, bajo la misma carga de sólidos por 12 h a 50°C, liberaron el 92% de la glucosa teórica. Posteriormente fermentaron los mejores hidrolizados con *S. cerevisiae* y obtuvieron el 81% y 43% de rendimiento teórico de etanol con el pre-tratamiento de NaOH y peróxido alcalino, respectivamente.

- **Pre-tratamiento de explosión con vapor**

El pre-tratamiento de explosión con vapor (SE) se basa en una combinación de efectos térmicos, químicos y mecánicos que actúan sobre la biomasa, solubilizan los azúcares hemicelulósicos, alteran la cristalinidad de la celulosa y rompen las fibras de lignina

induciendo transformaciones en su estructura. El SE considera un pre-tratamiento hidrotérmico en el cual la biomasa se somete a un calentamiento rápido por acción de vapor saturado a alta presión que se introduce en un reactor a temperaturas que se encuentran típicamente entre los 160 y 260°C (0,69-4,83 MPa), las cuales se mantienen por un periodo corto, que puede variar desde segundos hasta varios minutos (Sun & Cheng, 2002).

El uso del vapor permite un rápido calentamiento de la biomasa, sin diluir excesivamente los azúcares producidos durante el proceso (Mosier et al., 2005). A estas presiones altas, el vapor se condensa y permea la biomasa, iniciando una reacción de auto hidrólisis debido a los ácidos orgánicos generados por los grupos acetilo presentes en la hemicelulosa (Duque, Manzanares, Ballesteros, & Ballesteros, 2016). Esto resulta en el rompimiento de los enlaces glucosídicos y la subsecuente solubilización de la hemicelulosa. Además, cuando la presión es súbitamente liberada, la humedad condensada dentro de las fibras se evapora nuevamente, causando la disrupción mecánica de la matriz lignocelulósica (Carvalho, Duarte, & Gírio, 2008). Otra consecuencia es la reducción del tamaño de partícula de la biomasa debido a la descompresión instantánea (Duque et al., 2016).

Después del pre-tratamiento, el agua condensada y los sólidos insolubles se recuperan en la forma de un material pre-tratado llamado *slurry*⁸, que está compuesto de una fase líquida y una sólida. La fracción líquida, o pre-hidrolizado, contiene todos los azúcares solubles, principalmente azúcares hemicelulósicos y casi todos los productos de degradación generados durante el pre-tratamiento. En la fracción de los sólidos insolubles (WIS), se recuperan cantidades remanentes de celulosa, hemicelulosa y lignina (Duque et al., 2016).

Además de la extracción de la fracción de hemicelulosa que podría obtenerse en el líquido de pre-tratamiento, la tecnología del SE presenta ventajas en comparación con otras tecnologías. Entre ellas están un menor consumo de energía que en los pre-tratamientos mecánicos, y la reducción de los costos ambientales comúnmente asociados con los pre-tratamientos químicos. Además, el SE conduce a una alta recuperación de los azúcares, produciendo sustratos pre-tratados con buena digestibilidad enzimática, características

⁸ Slurry: lechada o lodo

que han demostrado su viabilidad a escala industrial (Alvira, Tomás-Pejó, Ballesteros, & Negro, 2010).

En el SE catalizado por un ácido, la biomasa lignocelulósica es impregnada con el catalizador escogido (típicamente con una cantidad entre 0,3% y 3% p/p) antes de la introducción en el reactor. El uso de un catalizador ácido presenta muchas ventajas tales como el mejoramiento en la tasa de hidrólisis, promoviendo la completa remoción de la hemicelulosa, y permitiendo la operación a bajas temperaturas de pre-tratamiento y tiempos de residencia (Duque et al., 2016).

Carvalho, Esteves, Parajó, Pereira, & Gírio (2004), evaluaron la producción de xilo-oligosacáridos (XOS) por hidrólisis de la cascarilla de cebada usando agua a diferentes temperaturas y tiempos de reacción. El máximo rendimiento de XOS fue del 61% de la materia prima (xitanos), cuando la reacción se llevó a cabo a 190°C después de 5 minutos de reacción. Estos autores concluyeron que tiempos largos de reacción disminuyen la producción de los oligosacáridos y aumentan la concentración de monosacáridos, ácido acético y productos de descomposición de los azúcares. La solubilización de los xitanos iniciales en el tratamiento de autohidrólisis correspondió a 63-77%.

Hasta la fecha, son pocas las investigaciones que se han realizado sobre la cascarilla de cebada empleando el pre-tratamiento del SE. Uno de estos referentes teóricos es el reporte de Kemppainen, Rommi, Holopainen, & Kruus, (2016), quienes estudiaron a través de siete ensayos el efecto de diferentes parámetros del SE sobre la solubilización de los carbohidratos y la proteína de la cascarilla de cebada, así como la composición y digestibilidad enzimática de los sólidos remanentes.

1.4.2 Extracción de la fracción de proteína presente en la cascarilla de cebada

El contenido de proteínas en la cascarilla de cebada, representa un alto potencial para la producción de hidrolizados de proteínas con características tecno-funcionales y propiedades biológicas, tales como ser inhibidores de la ACE (enzima convertidora de angiotensina o *angiotensin converting enzyme*, por sus iniciales en inglés) y presentar actividades antioxidantes y antiinflamatorias (Vieira, da Silva, Carmo, & Ferreira, 2017).

Para incrementar la aplicación potencial de las proteínas insolubles, estas pueden hidrolizarse (Kotlar et al., 2013). La hidrólisis de las proteínas se ha aplicado para mejorar los valores funcionales, organolépticos y nutricionales de los productos alimenticios. Los hidrolizados de proteínas funcionales pueden ser usados en sistemas alimenticios como aditivos, potenciadores de la textura de los alimentos o como ingrediente en formulaciones farmacéuticas. Algunas de estas propiedades son la unión de agua/aceite, emulsificación, formación de espuma, viscosidad y gelación, así como las propiedades antimicrobianas. Los hidrolizados de proteína se han usado ampliamente como suplementos nutricionales, ingredientes funcionales y potenciadores de sabor en alimentos, café, blanqueadores, cosméticos, productos de cuidado personal y confitería, y en la fortificación de productos alimenticios. El proceso de hidrólisis genera pequeños péptidos con características nutricionales mejoradas comparadas con la proteína original (Kotlar et al., 2013).

Vieira et al. (2014), usaron un proceso integrado totalmente reciclable para la extracción de proteínas y arabinoxilanos a partir de la valorización de la cascarilla de cebada. Implementaron una extracción de tres pasos donde incrementaron secuencialmente la concentración de álcalis como NaOH y KOH desde 0,1 M, 0,5 M hasta 4 M, en una relación de 1:2 p/v de cascarilla por volumen de solución alcalina a temperatura ambiente por 24 horas. Al finalizar el proceso los extractos alcalinos se acidificaron hasta pH 3 con ácido cítrico para obtener una fracción rica en proteínas. Los arabinoxilanos se recuperaron por precipitación con etanol y tanto el ácido cítrico como el etanol se reutilizaron. Esta integración permitió extraer las proteínas totales de la cascarilla con un rendimiento del 82-85% y un 66-73% de los arabinoxilanos, con la formación adicional de un residuo rico en celulosa, casi desprovisto de nitrógeno. Laine et al., (2015) también reportaron una recuperación cercana al 80% de los arabinoxilanos en el extracto alcalino que se obtuvo a partir de la cascarilla de cebada analizada, aunque la selectividad de la extracción fue pobre para las proteínas, lípidos y lignina.

Recientemente, Rommi, Niemi, Kemppainen, & Kruus, (2018) investigaron el efecto que tenía el pre-tratamiento de explosión con vapor sobre la hidrólisis enzimática alcalina de las proteínas de la cascarilla de cebada, comparando tres tratamientos: hidrólisis enzimática por una proteasa, extracción alcalina y precipitación ácida sobre la cascarilla

de cebada pre-tratada por el SE y sin pre-tratar. Sus resultados arrojaron que la proteína y la lignina se fraccionaron parcialmente tanto por la extracción alcalina como por la precipitación ácida, el pre-tratamiento de SE y la hidrólisis de los polisacáridos de las paredes celulares incrementaron sustancialmente la solubilización de la lignina y su recuperación por precipitación ácida. Mientras tanto, para la extracción efectiva de las proteínas se requirió el uso de una proteasa, lo que aumentó la solubilización de las proteínas del 15% a casi el 100% de la cascarilla no tratada. La explosión con vapor redujo la solubilización de la proteína enzimática, pero mejoró la recuperación del extracto en la etapa de centrifugación, presumiblemente debido a la menor capacidad de unión de agua de la cascarilla de cebada sometida al SE en comparación con la cascarilla de cebada no tratada. La lignina y la proteína mostraron una co-extracción clara y solo pudieron separarse parcialmente por precipitación ácida, lo que sugiere solubilidades similares e interacciones fuertes entre estos componentes.

1.5 Inhibidores de fermentación y métodos de detoxificación

Cada método de pre-tratamiento y cada biomasa puede generar hidrolizados que contienen diferentes conjuntos de componentes tóxicos. En general, pueden encontrarse tres clases de este tipo de compuestos: derivados de los furanos, ácidos alifáticos y compuestos fenólicos, como se observa en la Figura 1-8. Sumados a estos tres componentes mayoritarios, un amplio número de ácidos aromáticos, aldehídos y cetonas también pueden producirse en varios grados (Klinke, Thomsen, & Ahring, 2004).

Por ejemplo, durante la hidrólisis ácida de los materiales lignocelulósicos, los ácidos alifáticos (acético, fórmico y levulínico), derivados del furano y compuestos fenólicos se forman paralelamente a los azúcares liberados. El furfural y el 5-hidroximetil furfural (HMF) son los furanos más importantes, los cuales se producen por la descomposición de las pentosas y hexosas, respectivamente. Se ha reportado que el ácido acético se genera en la hidrólisis de los grupos acetilo que constituyen algunos enlaces en la estructura de la hemicelulosa, como consecuencia de la desacetilación de las pentosas acetiladas (Klinke et al., 2004). El ácido fórmico se produce por la degradación de los furanos, y el ácido levulínico por la degradación del HMF (Klinke et al., 2004). Múltiples compuestos fenólicos se obtienen a partir de la lignina, incluyendo la vainillina, ácido vainillínico, alcohol vainillilo, ácido 4-hidroxibenzoico, 4-hidroxibenzaldehído, ácido cumárico, siringaldehído, ácido

siríngico, cinamaldehído, alcohol dihidroconiferílico, hidroquinona, catecol, veratrol, acetoacetato, ácido homovanílico y las cetonas de Hibbert.

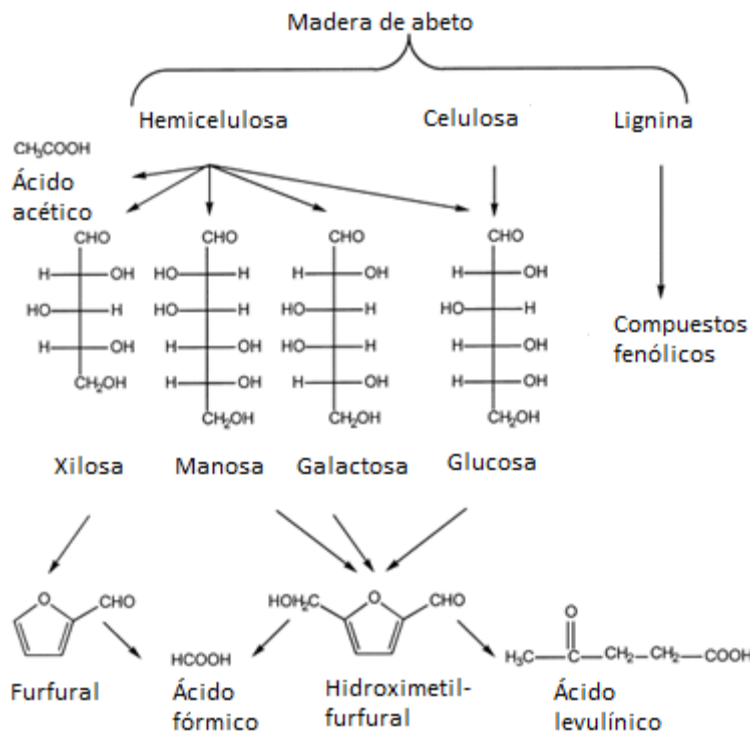


Figura 1-8. Reacciones que ocurren durante la hidrólisis de materiales lignocelulósicos. Los derivados del furano y los compuestos fenólicos pueden reaccionar adicionalmente para formar algunos materiales poliméricos

Reproducido de Bioresource Technology, autores: Eva Palmqvist, Bärbel Hahn-Hägerdal, Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition página 26, Copyright 2015, con permiso de Elsevier [3700830062790]

Los inhibidores de fermentación pueden presentar diferentes efectos tóxicos en las células. Por ejemplo, el HMF y el furfural, pueden causar un retraso de la fase de crecimiento, lo que causa que los microorganismos requieran más tiempo para realizar la fermentación. Los compuestos fenólicos penetran las membranas biológicas y causan la pérdida de su integridad, lo que afecta la capacidad de las membranas para servir como barreras selectivas. Se ha reportado que el crecimiento microbiano se encuentra inhibido en presencia de ácido acético a concentraciones mayores a 3,5 g/L en hidrolizados de hemicelulosa. Este fenómeno puede ocurrir debido a la entrada de ácido no disociado dentro del citosol (Chandel, Singh, & Venkateswar, 2010).

La disponibilidad de soluciones ricas en xilosa que tengan un precio bajo es uno de los principales obstáculos para la producción de xilitol. Desafortunadamente, debido a la complejidad química de las hemicelulosas, típicamente los hidrolizados que se obtienen contienen no solo los azúcares de la hemicelulosa, sino que también presentan ácidos alifáticos estructurales o fenólicos, así como otros compuestos tales como furaldehídos y ácidos débiles producidos por la degradación de los azúcares. Potencialmente, estos compuestos podrían actuar como inhibidores de la producción microbiana de xilitol (da Silva & Chandel, 2012).

Las estrategias de detoxificación se vuelven fundamentales para remover este tipo de compuestos tóxicos, y pueden resumirse en cuatro categorías: métodos físicos, químicos, biológicos e integrados (Figura 1-9).

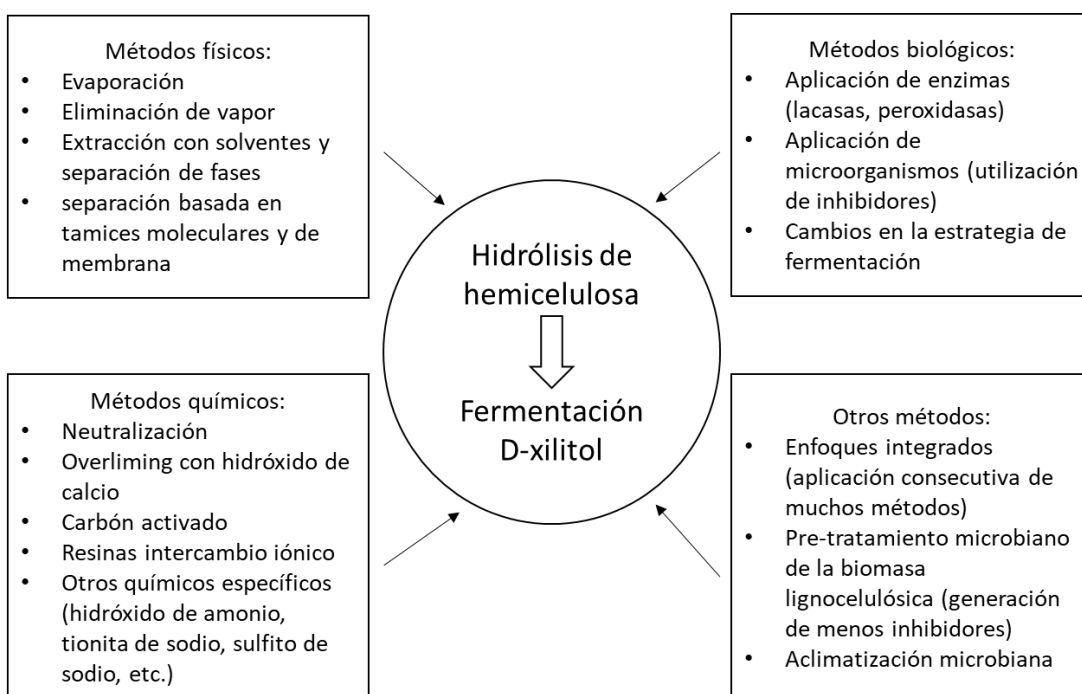


Figura 1-9. Resumen de varias estrategias de detoxificación aplicadas a hidrolizados de materiales lignocelulósicos, para la producción de xilitol

Reproducido de Springer eBook, autores: Tandiwe P. Mpabanga, Anuj K. Chandel, Silvio Silvério da Silva et al, Detoxification Strategies Applied to Lignocellulosic Hydrolysates for Improved Xylitol Production, página 70, Copyright 2018, con permiso de Springer Nature [4341031035301]

Se han propuesto varios métodos para lograr una buena detoxificación como, por ejemplo, el encalamiento con hidróxido de calcio o el uso de carbón activado y resinas de intercambio iónico. Recientemente, la detoxificación biológica a través del empleo de enzimas (lacasas) o el uso *in situ* de los organismos productores de estas sobre el hidrolizado tóxico están ganando una atracción significativa desde el punto de vista científico e industrial, ya que este tipo de proceso permitiría simultáneamente contrarrestar el efecto de los inhibidores formados, mientras la xilosa en solución se fermenta hasta xilitol (Mpabanga, Chandel, Silvério, & Singh, 2012), los métodos biológicos están ganando importancia porque son simples, tienen alta efectividad, son económicos y ambientalmente amigables (Parawira & Tekere, 2011).

1.6 Hidrólisis enzimática de la cascarilla de cebada y otras biomásas lignocelulósicas

Las investigaciones realizadas para hidrolizar enzimáticamente la cascarilla de cebada comprenden tanto el uso de cocteles de enzimas comerciales como de enzimas producidas *in situ* por microorganismos específicos. Forssell et al. (2008) encontraron un bajo nivel de hidrólisis usando cuatro mezclas de celulasas-hemicelulasas comerciales, ya que tan solo lograron solubilizar el 26-28% de los carbohidratos originales y el 30-34% de los arabinoxilanos originales, dependiendo del coctel enzimático empleado. Sin embargo, la cascarilla de cebada no tenía ningún pre-tratamiento previo y por ende la biomasa aún presentaba un nivel de recalcitrancia bastante alto. A su vez, el residuo quedó enriquecido en lignina y con la fracción de proteína casi inalterada. Amore et al. (2015), aislaron y evaluaron un *Bacillus amyloquefaciens* XR44A productor principalmente de actividad xilanasa sobre la cascarilla de cebada pre-tratada con una solución de amoníaco. Encontraron una recuperación de alrededor del 43% de la xilosa durante la sacarificación de la cascarilla, valor muy semejante al obtenido por una xilanasa comercial de *Trichoderma viride*.

Xiros et al. (2011), concluyeron que la hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa de la cascarilla de cebada, pre-tratada alcalinamente por el extracto enzimático de *Fusarium oxysporum* no se afecta por los mismos factores. Por ejemplo, la conversión satisfactoria de la celulosa puede lograrse incrementando la dosificación de la enzima con el fin de superar la inhibición del producto final, mientras que la estructura compleja de la

hemicelulosa restringe el uso de enzimas con actividades específicas, como, por ejemplo, la actividad de α -L-arabinofuranosidasa, la cual es necesaria para romper los enlaces 1,3 entre los sustitutos de la arabinosa en la columna vertebral de los xilanos. El tamaño de partícula también influye significativamente en la solubilización de los carbohidratos, por ejemplo Niemi et al. (2012) estudiaron la molienda como pre-tratamiento físico, con lo cual lograron no solamente reducir significativamente el tamaño de partícula de la cascarilla sino que también lograron aumentar dos veces el grado de solubilización de los carbohidratos.

Li et al. (2015) evaluaron la bio-conversión de un hidrolizado enzimático de tuzas de maíz hasta xilitol, a través de un proceso eficiente y amigable con el medio ambiente. Usaron las enzimas xilanolíticas producidas por *Aspergillus terreus* seguido de la fermentación del hidrolizado a través de *Candida tropicalis*. La producción máxima de xilanasa fue de 722 U/g y de β -xilosidasa 196 U/g partiendo de un medio optimizado que contenía salvado de trigo y tuzas de maíz en relación 7:3, NaNO₃ al 2% (v/v), Tween 80 al 0,05% (v/v), pH 6,8 y un nivel de humedad de 1:1, con un 20% de inóculo y 30°C por 120 h de cultivo. Estas enzimas se dosificaron para preparar el hidrolizado a partir de las tuzas de maíz, con lo cual lograron obtener 18,03 g/L de xilosa y 4,87 g/L de glucosa en 8 horas. Finalmente, este hidrolizado se usó para la producción de xilitol con *C. tropicalis* y después de la optimización de la fermentación lograron un rendimiento máximo de 75,14%.

1.7 Situación actual y usos potenciales de la cascarilla de cebada

En la actualidad, el uso de la cascarilla de cebada como materia prima se ha limitado a la elaboración de concentrados para animales, ya que es un excelente ingrediente alimenticio para los rumiantes, que inclusive se ha estudiado como sustituto del salvado de arroz en la dieta de los peces por su excelente aporte de proteínas y amino ácidos esenciales (Mussatto et al., 2006). Sin embargo, por estas características también tiene un alto potencial y beneficios para la salud humana (Buffington, 2014).

En la alimentación humana, Waters, Jacob, Titze, Arendt, & Zannini (2012) estudiaron el enriquecimiento de pan de trigo con cascarilla de cebada molida y fermentada con *Lactobacillus plantarum*, evaluando el contenido final de fibra, proteína y minerales

adicionados, lo que dio como resultado panes más suaves y con mayor elasticidad, además, de un nivel de aceptabilidad sensorial de hasta el 10%. Adicionalmente, extraer los compuestos que presentan un valor nutricional alto y que posteriormente puedan ser usados en la industria de alimentos también ha sido un campo de investigación promisorio a partir de esta biomasa. Así, Bohnsack, Ternes, Büsing, & Drotleff (2011) obtuvieron los tocotrienoles y tocoferoles a través de la extracción tipo Soxhlet variando el tamaño de partícula del material y el solvente empleado. Por otra parte, Reis et al. (2014) evaluaron el potencial prebiótico de los arabinosilanos presentes en la cascarilla de cebada, confirmando el potencial de la producción de ácidos grasos de cadena corta y la modulación de la microbiota intestinal, especialmente por el incremento de la población de bifidobacterias.

El gran interés de las aplicaciones biotecnológicas a partir de la cascarilla de cebada en el mundo, lo demostró la revisión realizada por Xiros & Christakopoulos (2012) quienes en su momento encontraron para el periodo 2007 a 2012, un gran número de publicaciones en este campo. Estas incluían la producción de enzimas y productos de valor agregado tales como antioxidantes, monosacáridos, oligosacáridos, xilitol, arabitol, bioetanol, biogás, ácido láctico o la producción de proteínas y lípidos funcionales. Así mismo, este trabajo concluyó que la implementación del fraccionamiento de la cascarilla de cebada a nivel industrial parecía ser el siguiente paso en la explotación de este tipo de residuos, logrando incorporar el concepto de biorrefinería a escala industrial, siempre y cuando los métodos adoptados garanticen la funcionalidad de los componentes obtenidos que son potencialmente valiosos.

Finalmente, también se ha explorado la aplicación de este tipo de residuo para la producción de energía y carbón (Mussatto et al., 2010), su uso como decolorante (Dhillon, Kaur, & Brar, 2012), en la industria del papel (Mussatto, Fernandes, Milagres, & Roberto, 2008) y como adsorbente (Kordialik-Bogacka, 2014).

1.8 Xilitol

El xilitol es un azúcar alcohol conformado por cinco átomos de carbono (Figura 1-10) que presenta características de edulcorante artificial. El uso seguro del xilitol se reconoció por la Comunidad Económica Europea desde 1984, y la agencia que regula las drogas y los

alimentos en los Estados Unidos (Food and Drug Administration-FDA) lo clasificó como “Generalmente Reconocido como Seguro” (GRAS por sus iniciales en inglés) desde 1986 y “Seguro para los dientes” desde 1994.

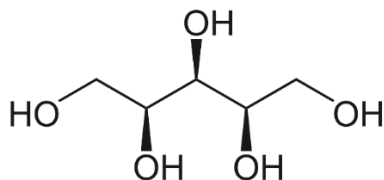


Figura 1-10. Estructura química del xilitol

La literatura incluye muchos estudios sobre el uso del xilitol como reemplazo de la sacarosa para ciertos alimentos, con el objetivo de reducir las calorías. Entre estos se encuentran los *cupcakes*, galletas, chocolates y gomas de mascar; adicionalmente sus propiedades endulzantes son similares a la sacarosa, pero con reducción sustancial de las calorías (2,4 vs. 4,0 cal/g).

En la industria farmacéutica se ha generalizado el uso del xilitol, debido principalmente a sus propiedades comprobadas como anticariogénico, las cuales pueden reducir la caries dental hasta en un 100%. Este azúcar-alcohol también es efectivo contra la formación de bio-películas orales. Además de luchar contra la caries dental, el xilitol es reconocido por ser capaz de contribuir a la calcificación de los dientes. También, ayuda a promover la salud oral como un beneficio para las mujeres en estado de embarazo y en periodo de lactancia (da Silva & Chandel, 2012).

Recientemente, se han encontrado reportes en los cuales se muestra la eficacia del xilitol en el tratamiento de varias enfermedades, como por ejemplo, en la diabetes, anemia, otitis media aguda y osteoporosis (da Silva & Chandel, 2012; de Albuquerque et al., 2014). El xilitol se ha empleado como azúcar sustituto en diabetes ya que se metaboliza a través de una ruta independiente de la insulina en el cuerpo humano (Huang, Jiang, Guo, & Hwang, 2011). Se ha usado en medicina como azúcar sustituto para la población con deficiencia eritrocítica de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (Akinterinwa, Khankal, & Cirino, 2008). A partir de xilitol podrían obtenerse derivados químicos como el ácido xilárico, propilenglicol, etilenglicol, ácido láctico y glicerol, entre otros, al considerarse como una molécula plataforma para la construcción de otros productos.

1.8.1 Proceso de producción de xilitol

▪ Método tradicional

Actualmente, el xilitol es producido en China a partir de tuzas de maíz y en Estados Unidos a partir de maderas duras como las provenientes de abedules. La xilosa proveniente del hidrolizado de la fracción de hemicelulosa se convierte a xilitol por una reacción química catalítica (Ravella, Gallagher, Fish, & Prakasham, 2012). La producción a gran escala del xilitol comenzó en 1975 en Finlandia, por la compañía Finnish Sugar Co. Ltda., en Helsinki. Este proceso, utiliza rutas químicas y se lleva a cabo a altas presiones (31-40 atm) y altas temperaturas (80-140°C) en reacciones que toman entre tres a cinco horas, dependiendo de las condiciones empleadas.

Actualmente la producción a gran escala se divide en varios pasos (Figura 1-11): (1) hidrólisis ácida del material natural rico en xilano, (2) purificación del hidrolizado hasta el punto donde se obtiene una solución pura en xilosa, (3) hidrogenación catalítica de la xilosa pura a xilitol con un catalizador (aleación Ni-Al₂), (4) purificación del xilitol obtenido en solución y (5) cristalización del xilitol (de Albuquerque et al., 2014). El rendimiento que se obtiene a través de la ruta química solo produce entre el 50-60% de conversión del xilano usado (Rafiqul & Mimi Sakinah, 2012).

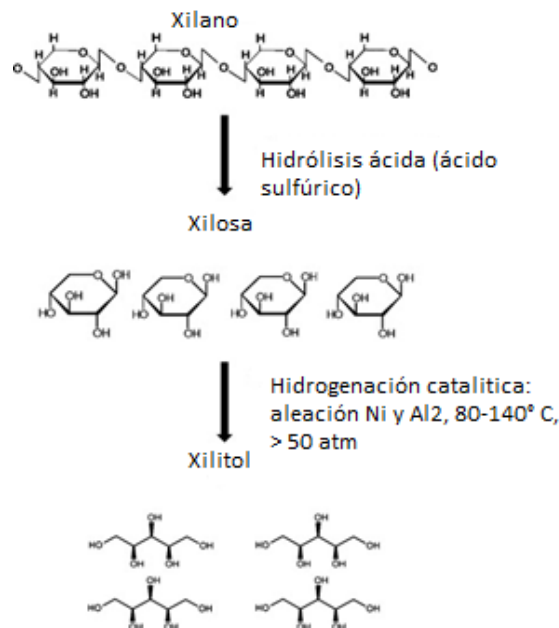


Figura 1-11. Ruta química para la producción de xilitol

Reproducido de Process Biochemistry, autores: Tiago Lima de Albuquerque, Ivanildo José da Silva, Gorete Ribeiro de Macedo, Maria Valdez Rocha, Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic wastes: A review, página 1781, Copyright 2015, con permiso de Elsevier [3699011484171]

▪ Método biotecnológico

De manera general, el proceso de producción de xilitol a partir de biomasa lignocelulósica incluye una etapa de pre-tratamiento, donde se deja disponible la fracción de hemicelulosa. Si el pre-tratamiento implica el uso de químicos, como ácido sulfúrico o ácido fosfórico (Ponte Rocha, Soares Rodrigues, de Albuquerque, Gonçalves, & de Macedo, 2014), se generan compuestos denominados inhibidores de fermentación (ácido acético y derivados del furano), por lo que se hace necesario detoxificar el hidrolizado obtenido. Después de la hidrólisis, sea ácida o enzimática, el hidrolizado puede fermentarse hasta obtener xilitol, el cual, por medio de las etapas finales de concentración y cristalización puede purificarse (de Albuquerque et al., 2014). El esquema general de proceso se muestra en la Figura 1-12.

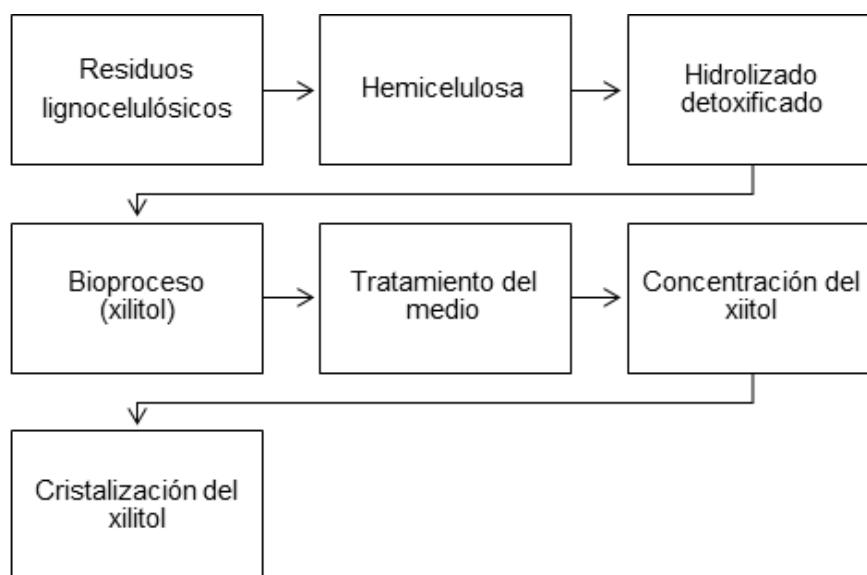


Figura 1-12. Diagrama de proceso para la producción biotecnológica de xilitol desde un material lignocelulósico. Adaptado de Wei et al., (2010)

Los autores que más han investigado paralelamente el proceso de producción de xilitol a partir de la cascarilla de cebada han sido Mussatto y Carvalheiro. Dentro de la investigaciones realizadas por (Mussatto & Roberto, 2005) se destaca el uso de ácido sulfúrico tanto para pre-tratar como para hidrolizar la fracción de hemicelulosa presente en la cascarilla, variando la concentración de ácido sulfúrico, la relación líquido/sólido y el tiempo de reacción, para posteriormente fermentar el hidrolizado obtenido con *Candida guilliermondii*. Las mejores condiciones para la hidrólisis ácida correspondieron a una relación de líquido/sólido de 8 g/g, 100 mg de H_2SO_4 por gramo de materia seca y un tiempo de reacción de 17 min. Bajo estas condiciones obtuvieron una eficiencia de extracción de los azúcares hemicelulósicos de 92,7% y buenos resultados de fermentación ($Y_{P/S} = 0,70$ g/g y $Q_P = 0,45$ g/(dm³h). Carvalheiro et al. (2004), optimizaron la producción del medio de cultivo enriquecido en pentosas a partir de la hidrólisis de la cascarilla de cebada con ácido diluido a un factor de severidad de 1,94, con lo cual lograron recuperar las pentosas en sus formas monoméricas en una cantidad >95% de la materia prima, junto con un bajo contenido de furfural, HMF, ácido acético, fórmico y compuestos fenólicos totales.

En el mismo año (S. I. Mussatto, Dragone, & Roberto, 2005)(Mussatto, Dragone, & Roberto, 2005b) reportaron el estudio cinético de *C. guilliermondii* sobre cuatro medios diferentes. Los dos primeros correspondieron al hidrolizado obtenido a partir de la cascarilla de cebada, el primero lo denominaron hidrolizado crudo porque correspondió a una concentración de 20 g/L de xilosa (tal cual se obtuvo de la hidrólisis) y el segundo correspondió al hidrolizado concentrado hasta 85 g/L de xilosa. El tercero y el cuarto correspondieron a medios semi-sintéticos que se prepararon a las mismas concentraciones de los azúcares obtenidos en la hidrólisis, solo que estos no tenían compuestos tóxicos. Los resultados de la cinética evaluada no arrojaron diferencias significativas entre el hidrolizado utilizado en forma cruda como el medio semi-sintético a la concentración de 20 g/L de xilosa. Sin embargo, en el medio concentrado, la eficiencia de producción de xilitol fue 30,6% y 42,6% más baja que en el medio crudo, y en el medio semi-sintético que contenía 85 g/L de xilosa, con lo cual concluyeron que la conversión de xilosa a xilitol se ve afectada fuertemente cuando la concentración inicial de xilosa se incrementa; sin embargo, este comportamiento no ocurrió con el medio semi-sintético, lo que a su vez se atribuyó a la presencia de los compuestos tóxicos en el hidrolizado concentrado.

Mussatto, Dragone, & Roberto (2005a), también reportaron la influencia de los compuestos tóxicos presentes en el hidrolizado sobre la bio-conversión de xilosa a xilitol, realizando una etapa de detoxificación con carbón activado previa a la fermentación y evaluando cuatro medios diferentes: crudo (RH), concentrado cuatro veces (CH), concentrado y tratado con carbón activado (TCH) y crudo suplementado con azúcares hasta una concentración cuatro veces superior (SRH). Los medios contenían una concentración inicial de 85 g/L con excepción del RH que contenía 23 g/L de xilosa. La fermentación reveló que suplementar con azúcares al hidrolizado crudo favoreció la producción de xilitol, pero que la presencia de compuestos tóxicos influye negativamente en la bio-conversión final de xilitol.

Por otra parte, Carvalheiro et al. (2005), evaluaron una ruta alternativa que consistía en dos pasos secuenciales para obtener un hidrolizado fermentable: auto-hidrólisis y post-hidrólisis (con ácido sulfúrico diluido). Posteriormente se evaluaron tres métodos de detoxificación para remover los compuestos inhibidores formados previamente: sobre-encalamiento, carbón activado y resinas de intercambio aniónico y catiónico, para

posteriormente fermentar hasta xilitol con *Debaryomyces hansenni*. Los mejores rendimientos de xilitol (0,51 y 0,50 g/g) y productividades (0,29 y 0,33 g/L/h) se encontraron tanto para el hidrolizado no-detoxificado y detoxificado con carbón activado, respectivamente.

Posteriormente, Mussatto et al. (2008) establecieron la concentración inicial óptima de xilosa y los suplementos nutricionales, variando la concentración de xilosa en el hidrolizado en 55, 75 y 95 g/L, y evaluando diferentes nutrientes tales como CaCl_2 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y extracto de salvado de arroz. El análisis estadístico arrojó como resultado, que la mejor concentración de xilosa en el hidrolizado fue 70 g/L y que no era necesario adicionar nutrientes externos al medio de fermentación, con lo cual encontraron un rendimiento de xilitol de 0,78 g/g y una productividad de 0,58 g/L/h. Finalmente, con el trabajo realizado por estos autores, se incluyó la producción de xilitol como una parte integral del concepto de biorrefinería aplicado al uso de los residuos de cascarilla de cebada. Mussatto et al. (2013) presentaron un análisis técnico-económico de este escenario en Brasil.

1.8.2 Bioquímica de la producción de xilitol (énfasis en levaduras)

El primer paso en el metabolismo de la D-xilosa es el transporte de los azúcares a través de la membrana celular. Algunas levaduras son capaces de transformar la xilosa en D-xilulosa a través de una vía secuencial de dos reacciones de óxido-reducción. Las enzimas claves para la producción de xilitol por parte de las levaduras corresponden a la xilosa-D reductasa (XR) y xilitol deshidrogenasa (XDH). Ambas requieren de nucleótidos tipo piridina como cofactores, aunque la especificidad de estos cofactores varía en las diferentes levaduras.

La Figura 1-13 muestra un esquema simplificado del metabolismo de la xilosa en las levaduras.

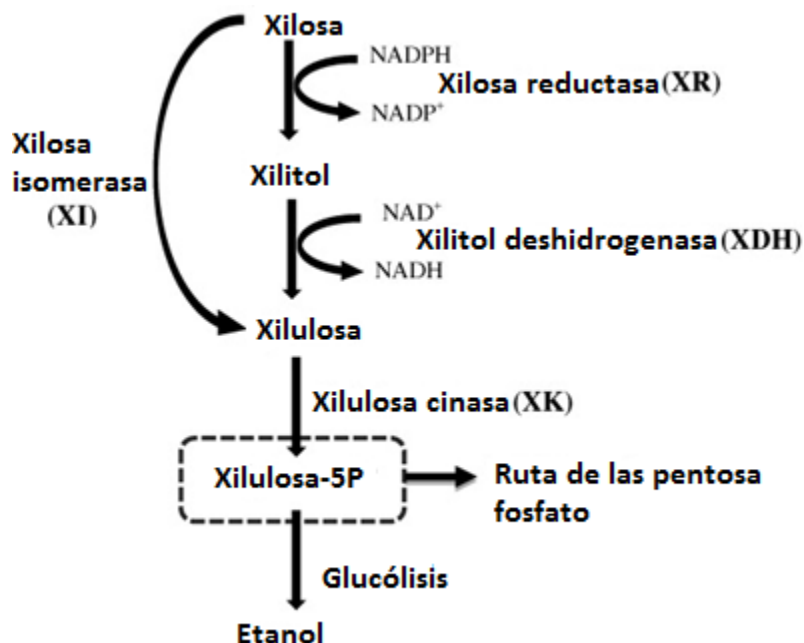


Figura 1-13. Ruta metabólica de xilitol en levaduras

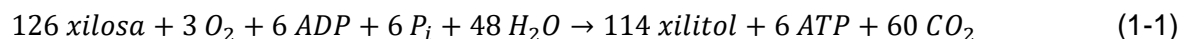
Reproducido de Process Biochemistry, autores: Tiago Lima de Albuquerque, Ivanildo José da Silva, Gorete Ribeiro de Macedo, Maria Valderez Ponte Rocha, Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic wastes: A review, página 1784, Copyright 2015, con permiso de Elsevier [3699011484171]

La conversión del D-xilitol ocurre en dos pasos: un paso de reducción seguido por uno de oxidación. Primero, la D-xilosa es reducida a D-xilitol por NADH o NADPH-dependiente de la XR. A continuación, este metabolito es oxidado a D-xilulosa por NAD o NADP⁺-dependiente de XDH. Estas dos reacciones son consideradas como los pasos limitantes en la fermentación de D-xilosa hasta la producción de D-xilitol. Algunas levaduras pueden metabolizar la D-xilulosa hasta xilulosa-5-fosfato mediante xiluloquinasa. La xilulosa-5-fosfato puede consecuentemente entrar a la ruta de las pentosas fosfato. Esta ruta consiste de una fase oxidativa que convierte las hexosa-fosfato a pentosas-fosfato, proporcionando NADPH necesario en las vías bio-sintéticas y una fase oxidativa en la que las pentosas-fosfato son convertidas en hexosas y fosfato triosas. La ruta de las pentosas fosfato también produce ribosa-5-fosfato que se utiliza para la síntesis de ácidos nucleicos, histidina y fosfato-4-eritrosa las cuales son necesarias para la síntesis de aminoácidos aromáticos. La vía de la fosfocetolasa presenta una ruta alterna para la utilización de la xilulosa-5-fosfato mediante su conversión en gliceraldehido-3-fosfato y fosfato-acetilo. El proceso de la formación de xilitol no puede parar después del primer paso, cuando la D-

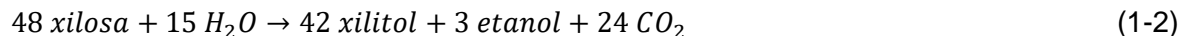
xilosa se convierte en xilitol. El crecimiento celular depende de algunos de los productos metabólicos anteriores y también es necesario regenerar los cofactores a través de los diferentes pasos en las vías metabólicas. Por lo tanto, para obtener un buen rendimiento de xilitol, la cantidad de xilosa que se puede convertir a xilitol y la cantidad de xilitol que se encuentre disponible para su uso posterior en el metabolismo, tiene que equilibrarse.

Bajo condiciones anaeróbicas o limitadas por el oxígeno, la diferencia en los requerimientos de los cofactores de estas enzimas provocan un desequilibrio redox que influye en la acumulación del xilitol (Parajó, Domínguez, & Domínguez, 1998), las levaduras con actividad XR dependiente tanto del NADH y NADPH (por ejemplo, *Pichia stipitis*) pueden regenerar el NAD⁺ consumido en el segundo paso del metabolismo de la xilosa. En este caso el mayor producto generado será el etanol y no la acumulación del xilitol (Parajó et al., 1998). La formación de xilitol se favorece bajo las condiciones limitadas de oxígeno, debido a la acumulación de NADH y a la inhibición posterior del NAD vinculado al xilitol deshidrogenasa. Este fenómeno, conocido como efecto Custer, resulta de la incapacidad de las levaduras de compensar el exceso de NAD.

Barbosa, de Medeiros, de Mancilha, Schneider, & Lee (1988), reportaron la reacción general (Ecuación 1-1) para el metabolismo de la xilosa en levaduras en medios balanceados nutricionalmente, usando NADH⁺2 como cofactor:



Con un rendimiento de producto teórico de 0,905 mol xilitol/mol xilosa. Bajo hipótesis similares, los mismos autores reportaron la reacción bajo condiciones anaerobias (Ecuación 1-2):



Con un rendimiento teórico de 0,875 mol xilitol/mol xilosa.

Entre los géneros capaces de producir xilitol, *Candida* ha sido el más estudiado y se erige como un microorganismo promisorio. Con este tipo de microorganismo, la disponibilidad

de oxígeno es el factor más importante en la producción de xilitol a partir de D-xilosa. Bajo condiciones limitadas de oxígeno, la fosforilación oxidativa no puede re-oxidar todo el NADH generado. Así, la concentración del NADH intracelular se incrementa permitiendo la acumulación del xilitol (de Albuquerque et al., 2014).

1.8.3 Condiciones para la producción de xilitol a partir de *C. guilliermondii*

▪ pH

El pH óptimo inicial del cultivo depende fuertemente de la especie utilizada. Este usualmente se encuentra en el intervalo de 5,5 a 6,5. Específicamente para *C. guilliermondii* tiene un valor de 5,5-6,0 (Salgado, Converti, & Domínguez, 2012).

▪ Temperatura

Las levaduras producen xilitol en el intervalo de 24 a 45°C, pero la temperatura óptima usualmente se encuentra entre 28 y 30°C, dependiendo del microorganismo. Para *C. guilliermondii* se ha reportado un valor de 28°C como el óptimo. Cuando las fermentaciones se llevan a cabo a temperaturas diferentes del valor óptimo, los rendimientos y productividades decrecen debido a la reducción de la actividad xilitol deshidrogenasa (Winkelhausen & Kuzmanova, 1998).

▪ Nutrientes del medio de cultivo

La concentración y el tipo de fuentes de nitrógeno son factores clave en la producción de xilitol por fermentación, aunque la influencia de ambas variables también depende de la levadura. En general, las fuentes de nitrógeno orgánico tales como urea, extracto de levadura, granos de arroz, peptona, etc., permiten obtener altas productividades y rendimientos comparados con las fuentes inorgánicas, porque su presencia estimula el paso oxidativo en la vía de las pentosas fosfato en varias levaduras (*C. boidinii*, *C. guilliermondii*, *C. mogii*, etc.). Algunas levaduras como *C. guilliermondii* y *P. tannophilus* requieren vitaminas tales como biotina, ácido ascórbico, piridoxina o colina (Salgado et al., 2012).

▪ **Concentración inicial de xilosa**

La concentración inicial de xilosa tiene un impacto significativo sobre la producción de xilitol por parte de las levaduras. El rendimiento de producto es bajo cuando se usan concentraciones iniciales de xilosa bajas, porque la fuente de carbono se usa principalmente para la producción de biomasa. Por el contrario, un aumento de la concentración de xilosa, incrementa el porcentaje de sustrato que es convertido a xilitol, incrementando de esta forma el rendimiento. Sin embargo, concentraciones muy altas de xilosa reducen el rendimiento debido al exceso de inhibición por sustrato y presión osmótica en el medio. Tales inhibiciones dependen del grado de aireación y de las especies. Para *C. guilliermondii* se ha reportado un valor de máximo 200 g/L (Salgado et al., 2012).

▪ **Concentración de oxígeno disuelto**

La concentración de oxígeno disuelto es uno de los parámetros más importantes que debe considerarse en la producción de xilitol, porque influye no solamente en los aspectos operacionales de la producción de xilitol, sino también en la fisiología de las levaduras. Este se ha investigado ampliamente en medios sintéticos y en hidrolizados de hemicelulosa. Los métodos empleados para medirlo han sido tan variados, que a menudo la comparación de los resultados obtenidos no es posible (Salgado et al., 2012).

Usando levaduras con actividad XR dependiente de NADPH, tales como *D. hansenii*, la concentración de O₂ disuelto debe ser controlada a bajos niveles para evitar el consumo del xilitol en la respiración. Para la producción de xilitol usualmente los valores óptimos de concentraciones de O₂ disuelto corresponden a condiciones micro-aeróbicas que permitan no solo la regeneración de NAD⁺ sino la producción de ATP y NADPH requerida para el mantenimiento del crecimiento celular y la actividad XR, respectivamente (Salgado et al., 2012).

Siendo esto así, los parámetros críticos que deben ser controlados durante la bioconversión de xilosa a xilitol son: la tasa de transferencia de oxígeno (OTR), el coeficiente de transferencia de oxígeno (k_{La}) y la tasa específica de consumo de oxígeno (q_{O_2}) (Salgado et al., 2012).

1.8.4 El mercado del xilitol

Impulsado cada vez más por los consumidores conscientes de los beneficios del xilitol en la salud y los problemas asociados al exceso de peso, se espera que la demanda del xilitol crezca en el sector de los alimentos sin azúcar y bajos en calorías. El mercado mundial del consumo del xilitol se estimó en 161.500 toneladas, por un valor de USD \$670 millones en el año 2013 y espera llegar a las 242 mil toneladas por un valor ajustado por encima de USD \$1 billón para el 2020 (da Silva & Chandel, 2012).

Actualmente, la industria de las gomas de mascar tiene el mayor consumo del mercado del xilitol en comparación con las otras industrias, con un 80% en el 2010 y se estima que consume alrededor de 163 mil toneladas para el 2020 y así continúe siendo el mayor consumidor de xilitol con el 67% del consumo mundial (da Silva & Chandel, 2012) (Venkateswar Rao, Goli, Gentela, & Koti, 2015), Figura 1-14.

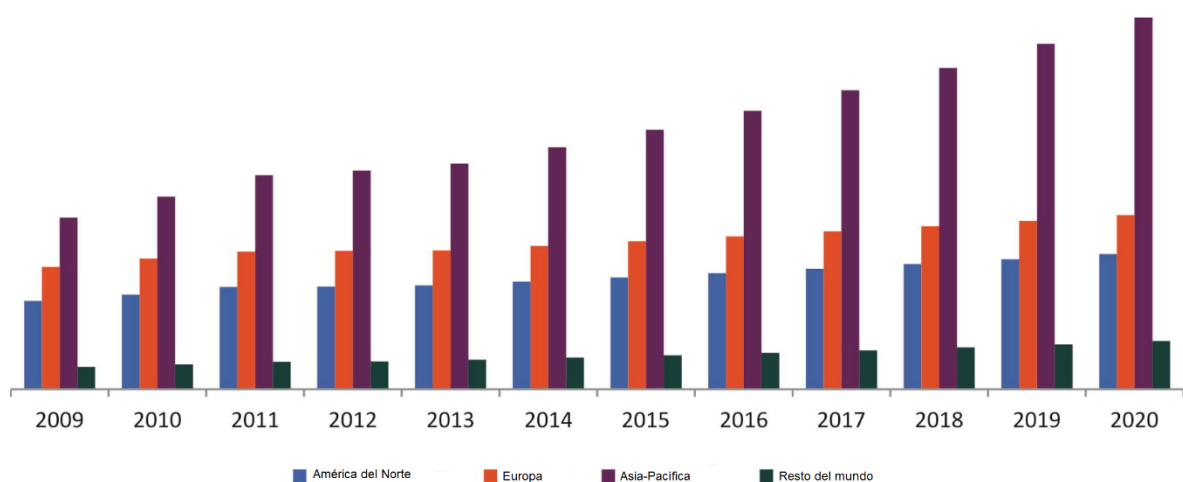


Figura 1-14. Mercado global de xilitol para la industria de gomas de mascar (2009-2020) por región en toneladas.

Reproducido de Bioresource Technology, autores: Linga Venkateswar Rao, Jyosthna Khanna Goli, Jahnvi Gentela, Sravanthi Koti, Bioconversion of lignocellulosic biomass to xylitol: An overview, página 301, Copyright 2018, con permiso de Elsevier [501394844]

Globalmente, Asia produce solamente el 50% del xilitol mundial, el resto de la producción se realiza en Europa, Estados Unidos y Australia. La región de Asia pacífica es el mayor consumidor de xilitol. En Asia Pacífica, China tiene el mercado más grande y se prevé que India tenga el crecimiento de mercado más grande (Venkateswar Rao et al., 2015). En la

Tabla 1-5 se muestran las mayores compañías productoras de xilitol de China y Estados Unidos (Ravella et al., 2012).

Tabla 1-5. Mayores compañías productoras de xilitol en el mundo

Compañía	Producción de xilitol en toneladas por año	Fuente
Futaste pharmaceutical Co., Ltd. China	35.000	Tuzas de maíz
Jining Hengda Green Engineering Co., Ltd. China	5.000	Tuzas de maíz
Hangzhou Shouxing Biotechnology Co., Ltd. China	15.000	Tuzas de maíz
Shandong Biobridge Technology Co., Ltd. China	6.000	Tuzas de maíz
Tangyin Hung Industrial Co., Ltd. China	2.500	Tuzas de maíz
Thomson Biotech (Xiamen) Pte. Ltd. China	10.000	Tuzas de maíz
Yucheng Lujian Biological Technology Co., Ltd. China	16.000	Tuzas de maíz
Zhejiang Huakang Enterprise Co., Ltd. China	20.000	Tuzas de maíz
Shijiazhuang Acid Chemical Co., Ltd.	10.000	Tuzas de maíz
Shengquan Healtang Biotech Co., Ltd. China	8.000	Tuzas de maíz
Xylitol USA, Inc.	-	Abedules
DuPont (Danisco), USA	2.000	Corrientes laterales de residuos de una planta de pulpa y papel

“Reproducido de D-Xylitol Fermentative Production, Application and Commercialization, autores: Sreenivas Rao Ravella, Joe Gallagher, Steve Fish, Reddy Shetty Prakasham, Overview on Commercial Production of Xylitol, Economic Analysis and Market Trends, página 294, Copyright 2015, con permiso de Springer [3704961279682]”

En Colombia, a la fecha, el Departamento Nacional de Estadística (DANE) no reporta producción de xilitol, razón por la cual se mostrarán los datos de producción e importaciones de azúcar, ya que esta podría ser reemplazada por el xilitol. De acuerdo con

Asocaña, en 2017 se produjeron 2,23 millones de toneladas de azúcar a partir de 24,38 millones de toneladas de caña. El consumo nacional de azúcar en Colombia fue de 1,67 millones de toneladas, destinado en un 52% al consumo directo en los hogares y un 48% a la fabricación de productos alimenticios, bebidas para consumo humano y otros productos industriales. En el año 2017, se exportaron 702 mil toneladas de azúcar, de las cuales el 66% se dirigió a Chile, Islas del Caribe, Perú, Estados Unidos, Haití, México y Bolivia. El resto del azúcar se exportó hacia múltiples destinos alrededor del mundo⁹.

De acuerdo con la Encuesta Anual Manufacturera (DANE, 2012), las importaciones colombianas de azúcar para el año 2012 fueron: azúcar cruda 210.099 t, azúcar cruda, refinada y pulverizada 708.535 t, sacarosa químicamente pura 620,4 t y azúcar con adición de edulcorantes 90,8 t. Uno de los principales usos del xilitol en la industria de alimentos es como aditivo en chicles. El consumo de chicles para el año 2012 en Colombia fue 2.258 kg.

⁹ <http://www.asocana.org/modules/documentos/5528.aspx> Recuperado el 29-04-2018.

2.Capítulo 2. Planteamiento del problema

2.1 Planteamiento del problema

Colombia es el tercer productor de cerveza en Latinoamérica y 21 en el mundo (Kirin Beer University Report, 2017). El proceso de producción de esta bebida alcohólica genera diferentes residuos, entre los cuales se destaca la cascarilla de cebada, ya que corresponde al co-producto que se obtiene en mayor cantidad. Teniendo en cuenta la producción nacional de cerveza, 1.910.000 kL en 2017, en el país se producen anualmente 191.000 toneladas de cascarilla de cebada en base húmeda. Por su contenido en proteína, hemicelulosa, celulosa, materiales extractivos y lignina, podría ser una materia prima promisorio y potencial para usarse en procesos físico-químicos y biotecnológicos, en los cuales logre transformarse en productos de mayor valor agregado implementando su aprovechamiento en el contexto de una biorrefinería, ya que tradicionalmente su aplicación se ha limitado solo para producir alimento para ganado (Xiros & Christakopoulos, 2012; Bavaria, 2013; Steiner et al., 2015).

A nivel mundial, se reconoce la importancia de buscar alternativas de aprovechamiento y valorización de este tipo de co-producto (Xiros & Christakopoulos, 2012; Steiner et al., 2015), buscando transformar las cervecías en biorrefinerías (Carvalho, Duarte, & Gírio, 2008; Mussatto et al., 2013), en las cuales se logre convertir esta biomasa en productos de mayor valor agregado. Teniendo en cuenta la importancia de la industria cervecera para el país, en términos de generación de empleo (4880 empleados directos en el 2016) (Bavaria, 2016) y pago de impuestos que se invierten en salud, educación, recreación y donaciones filantrópicas, es necesario impulsar este tipo de transformaciones, para lo cual en este proyecto se busca desarrollar productos y procesos útiles a partir de la cascarilla de cebada residual del proceso cervecero, incorporando el concepto de biorrefinería dentro del marco de las tendencias globales de aprovechamiento de los

residuos industriales para producir alimentos, productos químicos, productos farmacéuticos, materiales y biocombustibles avanzados.

El contenido de proteína, celulosa, hemicelulosa, materiales extraíbles y lignina hace posible su aprovechamiento para obtener productos como péptidos y aminoácidos, glucosa, xilosa, compuestos orgánicos, por ejemplo, compuestos fenólicos, moléculas plataforma que sirven de base para la obtención de otros productos químicos entre los que pueden mencionarse ácidos orgánicos como el p-cumárico, vainillina, etanol, sorbitol y xilitol. Particularmente, este último es atractivo industrialmente ya que tiene aplicaciones como edulcorante natural bajo en calorías, puede ser consumido por la población diabética, presenta propiedades comprobadas como anticariogénico, ayuda a la mineralización de los dientes y presenta potencial para combatir diversas enfermedades como la diabetes, anemia, otitis y osteoporosis. Encontrar rutas alternativas de proceso a partir de biomasas lignocelulósicas se convierte en una opción de aprovechamiento industrial con una perspectiva, gracias a que el mercado del xilitol se encuentra en constante aumento a nivel mundial.

Para que la cascarilla de cebada pueda ser fraccionada son necesarios procesos de extracción, pre-tratamiento, hidrólisis y fermentación. Estos procesos tienen como objetivo recuperar las proteínas, degradar la lignina para tener disponible la celulosa y la hemicelulosa, llevar estos polímeros a sus unidades monoméricas, las cuales finalmente pueden ser transformadas en productos químicos mediante vías biotecnológicas.

En este proyecto se proponen dos alternativas de proceso para integrar una etapa físico-químico y dos biotecnológicas dentro del concepto de biorrefinería, lo cual permitirá valorizar la cascarilla de cebada residual del proceso cervecero. Los dos procesos escogidos: pre-tratamiento alcalino y explosión con vapor, permiten extraer la mayor parte de la fracción de hemicelulosa en el líquido de pre-tratamiento, para el primero se hace indispensable realizar un estudio cinético y en el segundo superar los efectos barrera de la proteína y almidón en los fenómenos de transferencia de masa. Las dos fracciones de hemicelulosa en el líquido de pre-tratamiento extraídas principalmente como arabinoxilanos se someterán a etapas de hidrólisis enzimática diferentes, ya que los dos pre-tratamientos evaluados establecen diferencias estructurales químicas en los xilo-

oligosacáridos extraídos, así que el estudio de diferentes condiciones y variables de proceso con las enzimas comerciales puras y cocteles enzimáticos, permitirá obtener el mayor rendimiento a xilosa. Finalmente, la última etapa de fermentación tendrá en cuenta el efecto del coeficiente de transferencia de masa $k_L a$ como parámetro clave en la transformación de xilosa a xilitol en un reactor de 1 L. Las dos opciones de proceso planteadas no solamente evitan una etapa de detoxificación del hidrolizado obtenido, sino que valorizan las corrientes laterales producidas dentro del concepto de biorrefinería, siempre con el objetivo de que los procesos establecidos sean industrialmente competitivos.

2.2 Hipótesis

El proceso de extracción y pre-tratamiento físico-químico sobre la cascarilla de cebada co-producto del proceso cervecero, permitirá la deslignificación, remoción de las proteínas y solubilización de la hemicelulosa, para obtener una fracción de hemicelulosa principalmente tipo arabinoxilanos que sea susceptible de una hidrólisis enzimática a través de enzimas comerciales tipo endo-1,4- β -xilanasas, α -L-arabinofuranosidasas, β -xilosidasas y α -glucuronidasas, lo cual permitirá generar un hidrolizado rico en xilosa que se fermentará hasta xilitol por acción de una levadura.

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo general

Evaluar experimentalmente la producción de xilitol a partir de la cascarilla de cebada residual del proceso de producción de cerveza, empleando rutas físico-químicas en combinación con biotecnológicas.

2.3.2 Objetivos específicos

- Determinar el efecto del pre-tratamiento físico-químico sobre la deslignificación, extracción de proteínas y solubilización de la fracción de hemicelulosa presente en la cascarilla de cebada.

- Establecer las condiciones de proceso que permitan el mayor grado de hidrólisis de la fracción de hemicelulosa extraída en el pre-tratamiento físico-químico, mediante la interacción de enzimas comerciales puras.
- Evaluar la producción de xilitol a partir de la xilosa obtenida en el hidrolizado proveniente de la cascarilla de cebada, mediante fermentación.

2.4 Metodología (estrategia general)

Para abordar el problema de investigación planteado, metodológicamente se desarrolló una estrategia general que se dividió en tres etapas fundamentales para lograr la producción de xilitol a partir de la cascarilla de cebada. Las etapas fueron: pre-tratamiento, hidrólisis enzimática y fermentación, las tres etapas se realizaron en operaciones por lote.

Para el pre-tratamiento, se evaluaron dos alternativas diferentes: extracción alcalina y explosión con vapor con el objetivo de extraer la mayor proporción de la fracción de hemicelulosa en el líquido; en el caso de la extracción alcalina se esperaba corroborar la solubilización simultánea también de la fracción de la proteína y se planteó realizar un seguimiento en el tiempo de la extracción, ya que por literatura no se encontraron reportes teóricos que realizaran este tipo de análisis, a su vez se escogieron las condiciones de proceso más reportadas, aunque todos los ensayos se realizaron a presión atmosférica, para validar esta ventaja energética sobre el uso de este pre-tratamiento a presiones superiores a la atmosférica.

Para el pre-tratamiento de explosión con vapor fue necesario evaluar una etapa de desproteinización y eliminación de almidón previo al pre-tratamiento ya que las características de la cascarilla de cebada presentaron dificultad en la extracción de la fracción de hemicelulosa en la fracción líquida con esta tecnología, como se discutirá más adelante. Sin embargo, esta etapa previa al pre-tratamiento permitió también valorizar la fracción de la proteína en el proceso general planteado con este pre-tratamiento.

Para la segunda etapa del proceso, se contó con enzimas comerciales puras que presentan diferentes actividades específicas necesarias para lograr la hidrólisis completa de la compleja y diversa fracción de hemicelulosa extraída por las dos alternativas del pre-

tratamiento planteadas. La estrategia general de hidrólisis consistió primero en evaluar la sinergia de las enzimas puras sobre los AX separados del medio líquido en el pre-tratamiento alcalino, para validar la necesidad de trabajar con todos los tipos de actividades específicas. Para el caso de los AX extraídos en el líquido del pre-tratamiento con el SE, la estrategia consistió en concentrar el líquido y al obtenerse unas características químicas de los xilo-oligosacáridos extraídos totalmente diferentes a los extraídos alcalinamente fue necesario adicionar dos actividades enzimáticas más, tipo esterasas, a las ya iniciales endo-1,4- β -xilanasas, α -L-arabinofuranosidasas, β -xilosidasas y α -D-glucuronidasas, finalmente también se buscaron alternativas de hidrólisis enzimática con complejos comerciales, ya que estos presentan una alternativa al uso de enzimas altamente específicas, desde el punto de vista económico. En esta etapa la adición de las diferentes actividades enzimáticas, el porcentaje de combinación, la dosis y la temperatura fueron las principales variables de estudio.

Finalmente, la estrategia general para realizar la fermentación tuvo en cuenta el parámetro de escalamiento k_La como factor directamente relacionado con la concentración de oxígeno disuelto en el medio, la fermentación se realizó con un valor estándar de k_La según reportes de la literatura para la levadura usada. Para el hidrolizado obtenido del pre-tratamiento con SE se evaluó la toxicidad y la variación del pH del medio sobre la levadura en ensayos previos de matraz Erlenmeyer.

Cabe destacar que la estrategia general usada metodológicamente para dar cumplimiento a los objetivos busco evitar una etapa directa de detoxificación y valorizar las corrientes alternas que se producían en el proceso para integrarlas al menos teóricamente en el contexto de una biorrefinería.

3. Capítulo 3. Primera opción de proceso: pre-tratamiento alcalino

3.1 Resumen

La primera opción de proceso desarrollada en esta investigación comprendió la determinación de las condiciones de operación del pre-tratamiento alcalino sobre la cascarilla de cebada. Para ello se evaluó el rendimiento de extracción de la hemicelulosa, expresada como arabinoxilanos (AX) en el líquido de pre-tratamiento, mediante un diseño experimental que contempló dos factores: grado (severo y moderado) y nivel (alto y bajo), los cuales a su vez variaron la concentración de NaOH, temperatura, relación de alimentación (peso de cascarilla por volumen de solución alcalina) y velocidad de agitación.

El seguimiento de la reacción a través del tiempo, permitió el ajuste de una cinética de primer orden pseudo-homogénea irreversible según el modelo de Saeman, así como la determinación de la energía de activación para tres de las cuatro temperaturas evaluadas (ecuación de Arrhenius). El rendimiento máximo de AX que se obtuvo fue del 64,81% para el ensayo moderado, nivel alto a 12 horas de reacción.

La proteína y los AX extraídos en la fracción de hemicelulosa se separaron del líquido de pre-tratamiento. Los AX se caracterizaron y sometieron a una hidrólisis enzimática con seis enzimas comerciales puras, para obtener un hidrolizado rico en xilosa, que posteriormente se concentró y fermentó hasta la obtención de xilitol en un reactor de 1L, ajustando el $k_L a$ a 15 h^{-1} . Este proceso presentó la ventaja de evitar una etapa de detoxificación. El proceso se esquematiza en el diagrama de operaciones simplificado de la Figura 3-1. El rendimiento máximo de xilosa que se obtuvo en la hidrólisis enzimática fue del 63,63%. En la fermentación se obtuvo un rendimiento de producción de xilitol de 0,73 g/g con una productividad de 1,14 g/L/h.

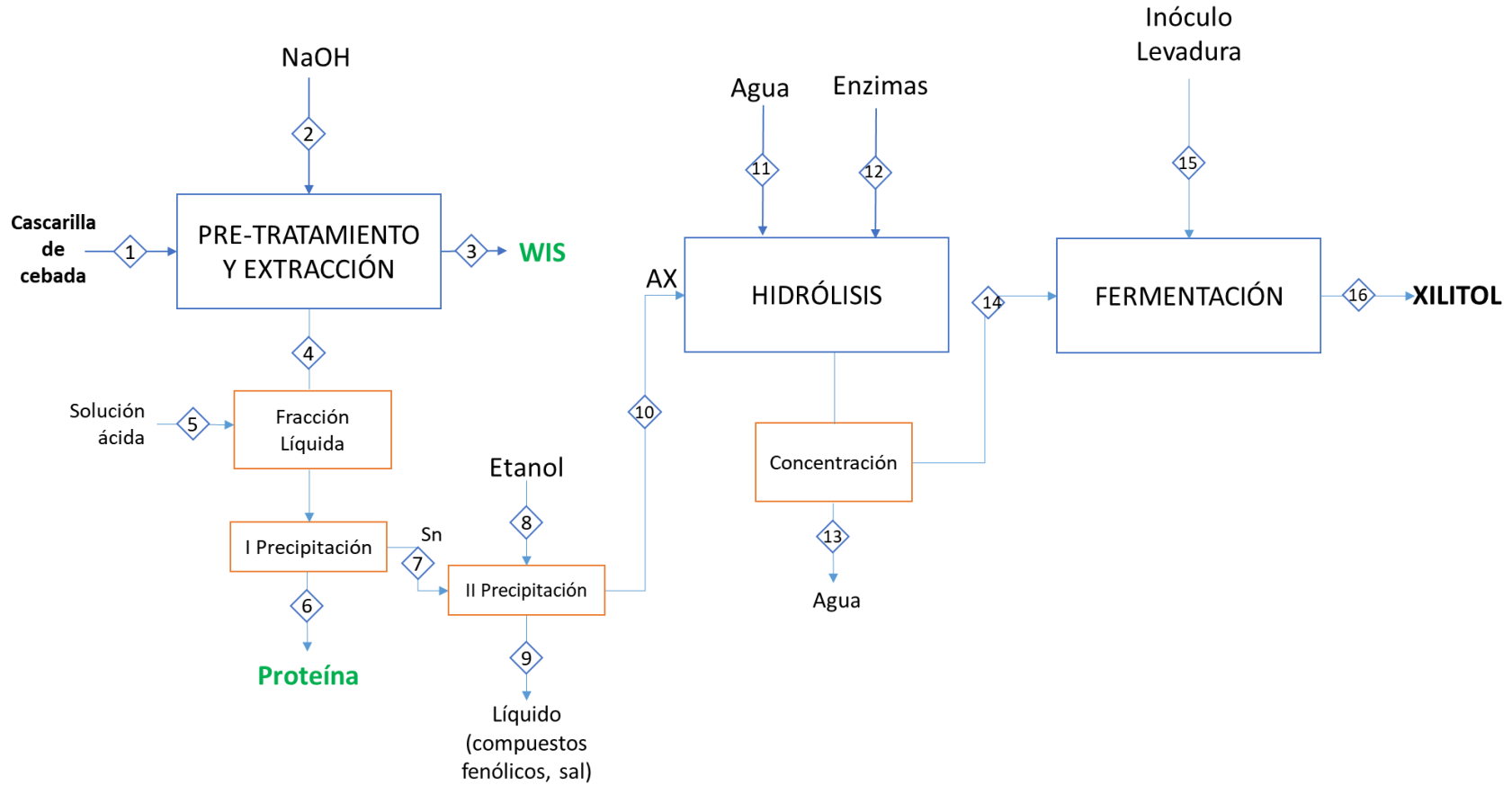


Figura 3-1. Diagrama de operaciones simplificado del proceso de obtención de xilitol a partir de cascarilla de cebada, a través del pre-tratamiento con NaOH

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Adecuación de la cascarilla de cebada

- **Muestreo**

La cascarilla de cebada proveniente del proceso cervecero fue suministrada en fresco por Bavaria S.A. La cascarilla se produjo en la planta ubicada en el municipio de Tocancipá, Cundinamarca.

- **Secado y molienda**

Debido al alto contenido de humedad ~77-81% y a la presencia de azúcares fermentables, la cascarilla es muy inestable y susceptible al ataque de microorganismos. Por lo tanto, para almacenarse y conservarse durante el desarrollo de la primera opción de pre-tratamiento alcalino, las muestras tomadas en planta, se secaron en un horno de convección a 45°C por 48 horas, hasta reducir su humedad (<10%). La cascarilla de cebada seca se sometió a la reducción del tamaño de partícula a través de un proceso de molienda en un molino de cuchillas hasta un tamaño <1mm para el proceso de caracterización y hasta un tamaño de partícula promedio de 501,2 μm para el pre-tratamiento.

3.2.2 Caracterización de la cascarilla de cebada

La cascarilla de cebada sin pre-tratar y pre-tratada se caracterizó siguiendo la metodología propuesta por los laboratorios Nacionales de Energías Renovables “NREL” por sus iniciales en inglés.

- **Humedad**

La humedad de la cascarilla de cebada se determinó siguiendo el procedimiento descrito por Hames et al., (2008). Para ello, se empleó una balanza de humedad Precisa XM120 ajustada a una temperatura de $105\pm 5^\circ\text{C}$.

- **Extraíbles**

Los materiales no estructurales de la biomasa se determinaron siguiendo el procedimiento descrito por Sluiter, Ruiz, Scarlata, Sluiter, & Templeton, (2008). Estos materiales se removieron realizando dos extracciones sucesivas en medio acuoso y orgánico (etanol),

empleando un extractor tipo Soxhlet. El proceso de extracción se realizó durante 24 horas para cada medio.

▪ **Lignina y carbohidratos estructurales**

La lignina y los carbohidratos estructurales de la cascarilla se determinaron siguiendo el procedimiento descrito por Sluiter, Hames, et al., (2008). La lignina se determinó gravimétricamente pesando los sólidos presentes en el material luego de una hidrólisis con ácido sulfúrico al 72% p/p (gravedad específica 1,6338 a 20°C). Los azúcares neutros (glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa y manosa) y el ácido acético se determinaron en el líquido ácido proveniente de la hidrólisis por cromatografía líquida de alta eficacia "HPLC" por sus iniciales en inglés.

▪ **Proteína**

La proteína se determinó por el método Kjeldahl, cuantificándose a través del contenido total de nitrógeno (factor 5,7).

▪ **Almidón**

Para la determinación de almidón total se utilizó el método colorímetro del Kit Total Starch Assay de la casa comercial Megazymes.

▪ **Cenizas**

El contenido de cenizas se determinó siguiendo el procedimiento descrito por Sluiter et al., (2008), calcinando una muestra de la biomasa libre de humedad en una mufla a $575\pm 25^{\circ}\text{C}$ por 4 h.

▪ **Análisis elemental**

El análisis elemental (N, P, K, B, Cu, Mn, Mg, Zn, Fe y Ca) se realizó en los laboratorios de Aguas y Suelos de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional. Los métodos de análisis fueron: micro-Kjeldahl, seguido de valoración volumétrica para el nitrógeno total, calcinación a 600°C y posterior valoración colorimétrica con molibdato y vanadato de amonio, para el fósforo total. Calcinación a 600°C y valoración por espectrofotometría de absorción atómica para el Ca, K, Mg, Cu, Fe, Mn, Zn. Calcinación a 600°C y valoración colorimétrica con azometina-H, para el boro total. Incineración con nitrato de magnesio y turbidometría, para el azufre total.

▪ SEM

Se realizaron fotografías por microscopía electrónica de barrido en un equipo VEGA3 TESCAN (República Checa), de la cascarilla de cebada sin pre-tratar y después del pre-tratamiento a 400 x.

3.2.3 Pre-tratamiento alcalino

Para determinar el efecto del pre-tratamiento alcalino sobre la deslignificación, extracción de proteínas y solubilización de la fracción de hemicelulosa presente en la cascarilla de cebada, se realizó un diseño experimental completamente al azar 2*2 de contraste ortogonal, con dos factores: grado que incluyó severo y moderado y dos niveles: alto y bajo (Tabla 3-1).

Tabla 3-1. Diseño experimental completamente al azar 2*2 de contraste ortogonal para el pre-tratamiento alcalino

Variable(↓)	Grado(→)	Severo		Moderado	
	Nivel (→)	Bajo	Alto	Bajo	Alto
Concentración de NaOH (M)		0,1	1	1,5	4
Temperatura (°C)		60	90	30	40
Relación de alimentación (peso de cascarilla de cebada por volumen de solución alcalina)		1:20	1:14	1:20	1:14
Tiempo (h)		0,5	2	12	24
Velocidad de agitación (rpm)		280	360	280	360

Las reacciones se realizaron en reactores de vidrio de 400 mL equipados con un sistema de calentamiento con resistencias internas y acoplados a un condensador y agitador de paletas planas, como se esquematiza en la Figura 3-2. En el primer paso se adicionaron 250 mL de agua al reactor y luego la biomasa se fue alimentando lentamente hasta alcanzar una dispersión completa del sólido con ayuda del agitador. Una vez que el sólido estaba completamente disperso, se ajustó la temperatura del ensayo, que se midió y controló con ayuda de una termocupla y un sistema de control. Este periodo se consideró como el de estabilización del sistema. Una vez alcanzada la temperatura del ensayo, se adicionaron 50 mL de la solución de NaOH (esta solución se encontraba más concentrada para que una vez se diluyera en el reactor se alcanzara la concentración deseada del ensayo). En este punto, se consideró el tiempo inicial de la reacción. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y a presión atmosférica (70,4 kPa). Para determinar la cinética

de la reacción, se tomaron muestras de 4 ml de *slurry* que contenían $0,3 \pm 0,05$ g de cascarilla de cebada pre-tratada en seis instantes, cuyo tiempo a partir del inicio de la reacción depende del ensayo particular. Las muestras se tomaron e inmediatamente se congelaron, para detener la reacción.

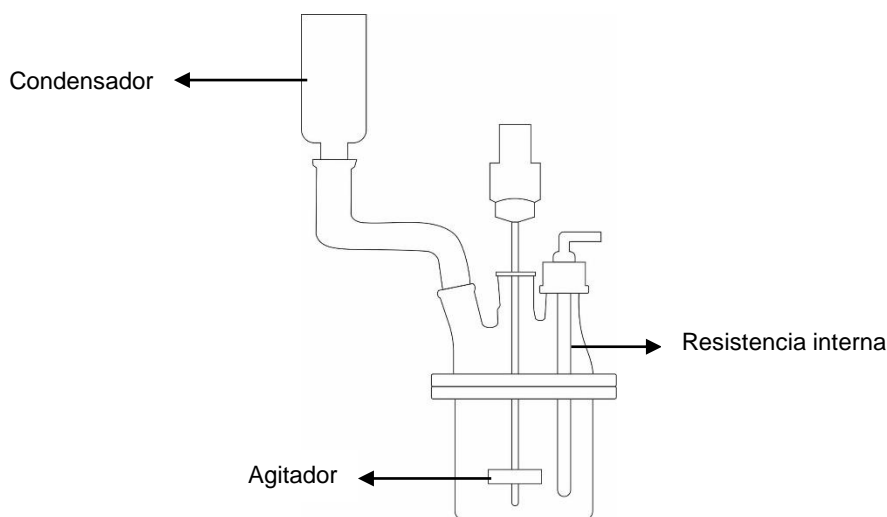


Figura 3-2. Esquema del reactor utilizado en el pre-tratamiento alcalino

Para el ensayo severo a nivel bajo se evaluaron tres etapas diferentes respecto al tiempo total de reacción, la primera etapa fue 30 minutos como lo consideraba el planteamiento del diseño experimental (Tabla 3-1), pero como se observará más adelante este tiempo fue insuficiente para alcanzar el equilibrio de la reacción. Por lo tanto, se planteó una segunda etapa donde se amplió el tiempo hasta 2,5 horas, pero de nuevo se observó que no se alcanzó el equilibrio de la reacción, haciendo necesario ampliar el tiempo de residencia hasta un tiempo final de 10,5 horas (tercera etapa).

3.2.4 Seguimiento de la reacción a través del tiempo

Las muestras se centrifugaron a 6000 rpm por 15 min en una Centrifuga Compacta Hermle Z206A para separar el líquido del sólido pre-tratado. Al líquido se le determinaron los AX extraídos, ácido acético, compuestos furanos y fenólicos liberados por HPLC. Los AX extraídos como azúcares oligoméricos en el líquido se hidrolizaron hasta azúcares monoméricos con H_2SO_4 al 4% v/v, 121°C por 30 min (Sluiter, Hames, Ruiz, Scarlata, Sluiter, & Templeton, 2008). Debido a la coelución de la xilosa, manosa y galactosa, estos tres azúcares se reportan juntos en esta parte del estudio. El ácido acético y los

compuestos furanos y fenólicos se cuantificaron como se describe más adelante en la sección 3.2.11. El sólido pre-tratado (WIS) solo se caracterizó al tiempo óptimo de máximo rendimiento de extracción de los AX y al tiempo final de pre-tratamiento.

3.2.5 Análisis estadístico

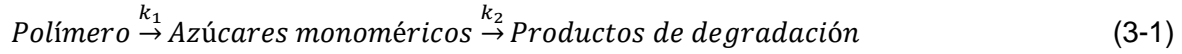
Para el análisis estadístico, se tomaron dos modelos diferentes. El primer análisis se realizó para los datos correspondientes a la cinética de reacción en cuanto al rendimiento de extracción de AX, xilosa, arabinosa y glucosa, mediante un modelo de medidas repetidas, teniendo en cuenta tres factores: grado (severo y moderado), nivel (alto y bajo) y tiempo (7 niveles, t_0 : tiempo inicial de la reacción y seis tiempos correspondientes a las seis tomas de muestras) sobre los tres reactores, lo que totalizó 84 observaciones. El análisis de los datos experimentales se realizó por análisis de varianza ANOVA con un nivel de significancia $\alpha=0.05$ utilizando el sistema estadístico SAS 9.4® (SAS, 2012).

Para el segundo modelo se tuvieron en cuenta los datos de composición en base seca (porcentaje de celulosa, hemicelulosa y lignina ácido insoluble) de la caracterización de la cascarilla de cebada sin pre-tratar y pre-tratada (WIS), mediante un diseño ortogonal completamente al azar 2^2 , en donde los factores fueron grado (severo y moderado) y nivel (alto y bajo), bajo un análisis de covarianza ANACOVA. Este análisis buscó evaluar la posible dependencia entre la composición inicial de la biomasa sin pre-tratamiento (covariable) y la composición final después del pre-tratamiento, lo que permitirá evaluar si los resultados del pre-tratamiento eran función o no de la composición inicial de la biomasa. Para ello se realizaron 72 observaciones, las cuales se analizaron con un nivel de significancia $\alpha=0,05$, utilizando el sistema estadístico Statistix 10® versión de prueba (2018).

Finalmente, tanto para el ANOVA como para el ANCOVA se realizó la comparación de medias por la prueba de Tukey-Kramer y Scheffe, respectivamente.

3.2.6 Teoría del modelamiento para la cinética de extracción

El modelo de Saeman (Saeman, 1945), se estableció bajo la suposición de que las reacciones que se producen durante la hidrólisis ácida son reacciones irreversibles pseudo-homogéneas de primer orden. El proceso puede expresarse, mediante las Ecuaciones 3-1, 3-2 y 3-3:



$$\frac{dP}{dt} = -k_1 P \quad (3-2)$$

$$\frac{dC}{dt} = k_1 P - k_2 C_m \quad (3-3)$$

Donde:

k_1 =Constante de velocidad de polímeros a monómeros, (h^{-1})

k_2 =Constante de velocidad de los monómeros a los productos de degradación, (h^{-1})

P, C_m = Concentraciones de los azúcares poliméricos y monoméricos, (g/L)

Aunque en esta investigación no se realizó un pre-tratamiento con ácido, se evaluó si el modelo cinético propuesto por Saeman, validado por Liu, Wang, & Wolcott, (2017) en el pre-tratamiento de bisulfito ácido sobre abetos de Douglas, podría ajustar y modelar los xilo-oligosacáridos extraídos con NaOH sobre la cascarilla de cebada. El enfoque usado fue el más simple, donde la caracterización de los AX extraídos como oligómeros se realizó mediante post-hidrólisis ácida (sección 3.2.4). Bajo estas condiciones, los oligómeros se hidrolizan a monómeros sin su descomposición posterior. Por lo tanto, puede determinarse la cantidad total de oligosacáridos solubles. La post-hidrólisis es muy importante para el análisis completo de los balances de masa, especialmente para la auto-hidrólisis que proporciona productos principalmente oligoméricos. Además, los datos sobre la post-hidrólisis contribuyen significativamente a una comprensión fundamental del mecanismo de hidrólisis de los polisacáridos (Negahdar, Delidovich, & Palkovits, 2016).

Los polímeros se reducen a azúcares simples incluyendo glucosa, xilosa, manosa, galactosa y arabinosa. Con base en esta reacción y resolviendo las ecuaciones diferenciales 3-2 y 3-3, las concentraciones de los monómeros (C_m) pueden representarse como una función del tiempo (t), tal y como se presenta en la Ecuación 3-4 y 3-5.

$$C_m = \frac{P_0 k_1}{(k_2 - k_1)} \times (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) \quad (3-4)$$

$$Y = \frac{C_m}{P_0} = \frac{k_1}{(k_2 - k_1)} \times (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) \quad (3-5)$$

Donde:

C_m =Concentración de azúcares monoméricos, (g/L)

P_0 =Concentración inicial de polímero, (g/L)

Y = Rendimiento de azúcares monoméricos, en porcentaje (%)

Una vez que las constantes de reacción (k_i) se determinaron, pueden correlacionarse los otros parámetros cinéticos importantes con la temperatura, usando la ecuación de Arrhenius (Ecuación 3-6).

$$k_i = A_i e^{\frac{-E_a}{RT}} \quad (3-6)$$

Donde:

k_i = constante de la velocidad de reacción ($i=1, 2$ o 3), (min^{-1})

A_i = factor pre-exponencial ($i=1, 2$ o 3), (min^{-1})

E_a =Energía de activación, (J/mol)

R = Constante de los gases, 8,314 (J/mol/K)

T =temperatura, (K)

3.2.7 Extracción de los arabinoxilanos

El *slurry* obtenido en el pre-tratamiento moderado-alto a 12 horas de reacción, en el que se obtuvo el mayor rendimiento de extracción de los AX, se separó por centrifugación en una fracción líquida y otra sólida, usando una Centrifuga Compacta Hermle Z206A a 6000 rpm por 15 min. La fracción líquida se sometió a dos precipitaciones selectivas para separar la proteína y posteriormente los AX extraídos.

Para lograr la precipitación de las proteínas solubles, el líquido se acidificó con una solución de H_2SO_4 hasta alcanzar un pH de 3 (Vieira et al., 2014). Este valor de pH permitió la precipitación de las proteínas gracias al punto isoeléctrico, las cuales finalmente se recuperaron por centrifugación. El sobrenadante que aún contenía los AX solubles y parte de la lignina degradada en forma principalmente de compuestos fenólicos, se separó a través de un proceso de precipitación con etanol azeotrópico y metanol. Este proceso permite separar los AX extraídos en el precipitado formado y solubilizar los compuestos fenólicos.

La cantidad de alcohol adicionado en proporciones volumétricas se realizó según los reportes de la literatura, en los cuáles las proporciones pueden variar desde 1:3 hasta 1:5 (Escarnot, Aguedo, & Paquot, 2011; Reis, Coelho, Coimbra, & Abu-Ghannam, 2015b; Li et al., 2016). En este ensayo se evaluaron entonces dos solventes: etanol y metanol (95%) en proporciones que variaron de 1:1 hasta 1:6, dejando la reacción por 12 horas en refrigeración a 4°C, para favorecer la precipitación de los polisacáridos.

3.2.8 Caracterización de los arabinoxilanos extraídos

▪ Determinación de azúcares neutros por cromatografía de gases

Los monosacáridos que componen la fracción de AX extraídos se pre-hidrolizaron en 0,2 ml de H₂SO₄ al 72% (p/p) por 3 h a temperatura ambiente, seguido de hidrólisis con H₂SO₄ 1 M a 100°C por 2,5 h. Los azúcares neutros liberados se analizaron posteriormente como sus acetatos de alditol por cromatografía de gases (GC) con un detector de ionización de flama (FID). Las hidrólisis de todas las fracciones se realizaron por duplicado.

▪ Determinación de ácidos urónicos

Los ácidos urónicos se cuantificaron por el método colorimétrico 3-fenil fenol (Coimbra, Delgadillo, Waldron, & Selvendran, 1996), después de que los AX extraídos se pre-hidrolizaron en 0,2 ml de H₂SO₄ al 72% (p/p) por 3 h a temperatura ambiente, seguido de hidrólisis con H₂SO₄ 1 M a 100°C por 2,5 h.

▪ Determinación de enlaces glucosídicos

Los enlaces glucosídicos se determinaron por cromatografía de gases y espectrometría de masas (ESI-MS) de los acetatos de alditol parcialmente metilados, usando CH₃I como reactivo de metilación (Coelho, Rocha, Saraiva, & Coimbra, 2014). La metilación de todas las fracciones se realizó por duplicado.

El grado de ramificación (DB) se calculó como la relación entre los puntos de ramificación en los residuos de Xyl sustituidos y la cantidad total de Xyl: $[Xyl_{subst}/Xyl_{total}]$, donde la Xyl_{subst} fue la suma de (2,4-Xyl+3,4-Xyl+2*2,3,4-Xyl).

3.2.9 Hidrólisis enzimática

Para la hidrólisis enzimática se contó con seis enzimas puras de la casa comercial Megazymes. Su actividad específica y principales características, se describen en la Tabla 3-2 y sus fichas técnicas se presentan en el Anexo A.

Tabla 3-2. Características principales de las enzimas comerciales puras estudiadas

No.	Enzima	Microorganismo	Familia	T óptima (°C)	pH óptimo
1	endo-1,4-β-Xilanasa	<i>Neocallimastix patriciarum</i>	GH11	50°C (10 min reacción)	6,0-6,5
2		<i>Cellvibrio japonicus</i>	GH10	60°C (10 min reacción)	5,0
3	α-L-Arabinofuranosidasa	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	GH43	n.r.	5,5-6,0
4		<i>Aspergillus niger</i>	GH51	n.r.	4,0
5	β-D-Xilosidasa	<i>Selenomonas ruminantium</i>	GH43	50	5,0
6	α-Glucuronidasa	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	GH67	70	7,0

n.r. no reportado en la ficha técnica

Los AX extraídos del ensayo moderado-nivel alto a las 12 horas de reacción, se separaron del medio líquido como se describió en la sección 3.2.7, convirtiéndose en el sustrato para la hidrólisis enzimática. La reacción se adecuó a una concentración de 1 g/L en buffer succinato de sodio 100 mM pH 5,5 a una temperatura de 40°C. La temperatura de la reacción se estableció como un balance de las temperaturas óptimas de las seis enzimas puras evaluadas, teniendo en cuenta tanto el valor óptimo reportada en la ficha técnica de las enzimas, como lo referentes de la literatura para este tipo de reacciones enzimáticas (Xiros et al., 2011, Rasmussen, Xu, Sørensen, Nielsen, & Meyer, 2012, McCleary et al., 2015). Para el pH se tomó la referencia del estudio de McCleary et al., (2015) que se presenta en la Figura 3-3.

En la Figura 3-3 se observa que la endo-1,4-β-xilanasa de *N. patriciarum* (Np XYLase), β-xilosidasa de *Selenomonas ruminantium* (Sr XOSase) y la α-L-arabinofuranosidasa de *Bifidobacterium adolescentis* (Ba AFase) tienen el 100% de actividad a pH 5,5, la α-L-arabinofuranosidasa de *Aspergillus niger* (An AFase) tiene aproximadamente el 40% de su actividad, ya que su pH óptimo es 4 y la α-L-arabinofuranosidasa de *U. maydis* no se utilizó en estos ensayos.

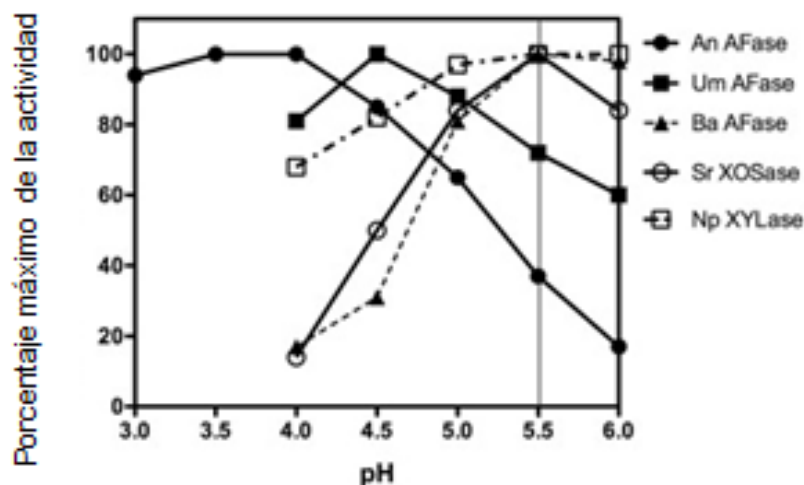


Figura 3-3. pH óptimo para las diferentes actividades enzimáticas empleadas en el ensayo de hidrólisis enzimática. α -L-Arabinofuranosidasa de *Aspergillus niger* (An AFase), α -L-Arabinofuranosidasa de *U. maydis* (Um AFase), α -L-Arabinofuranosidasa de *Bifidobacterium adolescentis* (Ba AFase), β -xilosidasa de *Selenomonas ruminantium* (Sr XOSase) y endo-1,4- β -xilanasa de *N. patriciarum* (Np XYLase)

Reproducido de Carbohydrate Research, volumen No. 407, autores: Barry V. McCleary, Vincent A. McKie, Anna Draga, Edward Rooney, David Mangan, Jennifer Larkin, Hydrolysis of wheat flour arabinoxylan, acid-debranched wheat flour arabinoxylan and arabino-xylo-oligosaccharides by β -xylanase, α -L-arabinofuranosidase and β -xylosidase, página 93, Copyright 2018, con permiso de Elsevier [4340600382629]

▪ Ensayo de efecto sinérgico entre las enzimas

La primera etapa del estudio contempló la variación en la adición de una o dos enzimas en la mezcla de reacción total, a una dosis fija de 0,2 mg de mezcla de enzimas-proteína/g AX potencial. En la Tabla 3-3 se presenta la nomenclatura y definición de las enzimas presentes en cada ensayo. El objetivo de la variación en la adición de una o dos enzimas fue observar la sinergia entre las diferentes actividades enzimáticas específicas, respecto a las diferentes familias que se tenían para dos de las actividades específicas generales: endo-1,4- β -xilanasas y α -L-arabinofuranosidasas.

Tabla 3-3. Definición de la adición de las enzimas y nomenclatura de los ensayos llevados a cabo para evaluar el efecto sinérgico.

Adición de las enzimas	Nomenclatura del ensayo	Definición de las enzimas presentes en el ensayo
Todas	I	Todas las enzimas
Sin una enzima	II	Todas las enzimas menos endo-1,4- β -xilanasa (GH11)
	III	Todas las enzimas menos endo-1,4- β -xilanasa (GH10)
	IV	Todas las enzimas menos α -L-arabinofuranosidasa (GH43)
	V	Todas las enzimas menos α -L-arabinofuranosidasa (GH51)
Sin dos enzimas	VI	Todas las enzimas menos endo-1,4- β -xilanasa (GH11) y α -L-arabinofuranosidasa (GH43)
	VII	Todas las enzimas menos endo-1,4- β -xilanasa (GH11) y α -L-arabinofuranosidasa (GH51)
	VIII	Todas las enzimas menos endo-1,4- β -xilanasa (GH10) y α -L-arabinofuranosidasa (GH43)
	IX	Todas las enzimas menos endo-1,4- β -xilanasa (GH10) y α -L-arabinofuranosidasa (GH51)

En la Tabla 3-4 se presenta el porcentaje de combinación de las enzimas que se adicionaron para este ensayo.

Tabla 3-4. Porcentaje de combinación de las enzimas utilizadas para evaluar la sinergia entre las enzimas puras

No.	Enzima	Familia	Porcentaje de combinación (%)
1	endo-1,4- β -Xilanasa	GH11	3,4
2		GH10	37,2
3	α -L-Arabinofuranosidasa	GH43	8,3
4		GH51	15,0
5	β -D-Xilosidasa	GH43	4,8
6	α -Glucuronidasa	GH67	31,4

Para estos ensayos se realizó una curva de progreso dividida en dos etapas, la primera etapa cubrió el seguimiento de la reacción desde el tiempo cero hasta los 90 minutos de reacción tomando muestras a los 10, 20, 40, 60 y 90 minutos y la segunda etapa dejando la reacción hasta las 48 horas, tomando muestras después de los 90 minutos a las 4, 18,

24 y 48 horas. Todos los ensayos se realizaron por duplicado y la diferencia de medias se evaluó estadísticamente por prueba de Tukey.

3.2.10 Fermentación

▪ Microorganismo

Para la fermentación se utilizó la cepa *Candida guilliermondii* FTI 20037, considerada como un microorganismo promisorio para la conversión de xilosa a xilitol.

▪ Producción de inóculo

Para preparar el inóculo se tomó una asada de células reactivadas en agar YPG por 48 horas a 30°C que se transfirieron a un matraz Erlenmeyer de 250 mL, el cual contenía 100 mL de un medio compuesto por (g/L): xilosa (20), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,1), KH_2PO_4 (2), extracto de levadura (4) y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,4). El inóculo se incubó a 30°C y 200 rpm por 24 horas, las células se separaron posteriormente por centrifugación a 8000 rpm por 15 min en una centrifuga en una centrífuga Sorvall RC 6 Plus Thermo Scientific Co (Waltham, MA, USA) y se suspendieron en solución salina (0,85%).

▪ Fermentación en reactores de 1 L

La fermentación se llevó a cabo en reactores de tanque agitado de 1 L Biostat® Bplus (Sartorius Stedim Biotech, Alemania) que contenían 0,6 L de medio concentrado, previa hidrólisis enzimática de los AX provenientes de la cascarilla de cebada a una concentración (g/L) de xilosa (81,4) y arabinosa (32,8) por duplicado e inoculados con 1 g/L de células. El fermentador estaba equipado con un agitador con dos impulsores de seis paletas planas con disco. La temperatura se ajustó y mantuvo a 30°C durante todo el ensayo. La velocidad de agitación se parametrizó a 300 rpm y el flujo de aire se ajustó a 1,35 vvm, como la aireación adecuada en el sustrato para obtener un valor inicial de k_{La} de 15h^{-1} . En todos los experimentos el pH inicial se ajustó a 5,5 y se monitoreó a lo largo de toda la fermentación. Las muestras se tomaron periódicamente para determinar las concentraciones de azúcares, metabolitos extracelulares y biomasa.

▪ **Determinación de k_La , método dinámico**

Para determinar el k_La (h^{-1}), el oxígeno disuelto en el medio antes de la inoculación se midió mediante un electrodo polarográfico Ingold calibrado, usando el método indirecto (sin microorganismos). El k_La se calculó mediante las Ecuaciones 3-7 y 3-8:

$$\frac{dC}{dt} = k_La \cdot (C_S - C_L) \quad (3-7)$$

$$k_La \cdot t = -\ln\left(\frac{C_S - C_L}{C_S}\right) \quad (3-8)$$

Donde C_L y C_S son las concentraciones (mg/L) de oxígeno en el seno de la fase líquida y la saturación, respectivamente, y C (mg/L) es la concentración de oxígeno disuelto a tiempo t (h). La pendiente de la línea recta corresponde al k_La (Anexo B).

3.2.11 Métodos analíticos

▪ **Determinación de azúcares, ácido acético y xilitol por cromatografía líquida**

Los azúcares neutros y el ácido acético se determinaron por HPLC en un cromatógrafo Dionex UltiMate 3000 (Thermo Scientific, USA) equipado con un detector Shodex RI-101 (Showa Denko K.K., Japan) y una columna Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm; Bio-Rad, Hércules, CA, USA) a 65°C. La fase móvil fue ácido sulfúrico 5 mM, a un flujo de 0,5 mL/min y una inyección de muestra de 20 μ L.

▪ **Determinación de inhibidores de fermentación**

Los compuestos fenólicos y derivados del furano se determinaron por HPLC en un cromatógrafo Dionex UltiMate 3000 (Thermo Scientific, USA) equipado con un detector UV a una longitud de onda de 270 nm y una columna Chromolith C18 marca Merck a 30°C. La fase móvil fue una mezcla de agua, metanol y ácido acético, a un flujo de 2 mL/min, usando un gradiente de $t=0$ min 100% fase móvil, $t=9$ min 40% metanol y 60% fase móvil, $t=10$ min 40% metanol y 60% fase móvil y $t=12$ min 100% fase móvil.

▪ **Cuantificación de biomasa**

La concentración celular se determinó por análisis espectrofotométrico a 600 nm. La conversión a peso seco se realizó mediante la densidad óptica usando una curva de calibración (Anexo C).

3.3 Resultados y discusión de resultados

3.3.1 Caracterización de la cascarilla de cebada

En la Tabla 3-5, se presenta la caracterización de la cascarilla de cebada proveniente de la cervecería Bavaria S.A. La cascarilla de cebada fresca tuvo una humedad de $79,86 \pm 0,94\%$.

Tabla 3-5. Composición de la cascarilla de cebada proveniente de la cervecería Bavaria S.A. (materia seca, %)

Componente	Contenido (% en base seca)
Glucanos	18,36
Celulosa	$17,15 \pm 1,82$
Almidón	$1,21 \pm 0,05$
Hemicelulosa	25,13
Xilano	$16,21 \pm 1,13$
Galactano	$1,35 \pm 1,82$
Arabinano	$7,22 \pm 0,61$
Manano	$0,36 \pm 0,02$
Lignina	16,69
Ácido insoluble	$12,70 \pm 0,69$
Ácido soluble	$4,22 \pm 0,14$
Extraíbles	22,58
Acuosos	$9,26 \pm 0,61$
Orgánicos	$13,32 \pm 0,36$
Grupos acetilo	$0,55 \pm 0,0008$
Proteínas	$14,50 \pm 0,07$
Cenizas totales	$3,93 \pm 0,04$

Como se observa en la Tabla 3-5, la cascarilla de cebada está compuesta por 18,36% de glucanos, distribuidos en 93,4% de celulosa y 6,6% de almidón. La fracción de hemicelulosa fue 25,13% distribuida principalmente en xilano (16,21%), arabinano (7,22%) y galactano (1,35%), lo cual corrobora el carácter arabinoxilano de la hemicelulosa de esta biomasa y arroja un potencial de producción total de xilosa de 18,42%.

El contenido total de la lignina fue 16,69% del peso seco, distribuido en 76,1% de ácido-insoluble y 23,9% de ácido-soluble. Las cenizas totales fueron 3,93% y los grupos acetilo 0,55%.

Vale la pena resaltar que esta biomasa tiene un contenido de extraíbles acuosos y orgánicos de 22,58% de la materia prima. En los extractivos acuosos se detectaron principalmente oligómeros de glucosa (1,11%) y cantidades traza de xilosa, arabinosa y galactosa.

La cascarilla de cebada al ser un co-producto industrial que no tiene las características propiamente estructurales de un material lignocelulósico, presentó cantidades importantes de proteína en su estructura. Esta proteína correspondió a un total de 18,73%, pero corregida por los extractivos fue 14,50%.

En la Tabla 3-6 se presenta la caracterización respecto al contenido de metales. El contenido de cobre, hierro, manganeso, zinc encontrados en la cascarilla de la cervecería colombiana fue menor que el reportado para la cascarilla proveniente de una micro cervecería en Brasil: 18,0 (Cu), 193,4 (Fe), 51,4 (Mn), 178,0 (Zn) mg/kg (Mussatto & Roberto, 2006). Aunque en este análisis no se determinó el silicio, Mussatto & Roberto, (2006) reportaron que las cenizas de la cascarilla de cebada son ricas en silicio (1,074%), aunque también presentan altos contenidos en fósforo y calcio, como se encontró en este estudio.

Tabla 3-6. Análisis elemental de la cascarilla de cebada proveniente de la cervecería Bavaria S.A.

Elemento	Contenido (% en peso)	Elemento	Contenido (mg/kg)
N	3,24	Cu	11,5
P	0,53	Fe	138
Ca	0,34	Mn	33,8
K	0,04	Zn	101
Mg	0,15	B	3,46

3.3.2 Pre-tratamiento alcalino

El seguimiento del pre-tratamiento alcalino de la cascarilla de cebada a través del tiempo se midió a través de la variable de respuesta: rendimiento de extracción de azúcares potenciales, que se cuantificaron para la glucosa, xilosa+galactosa+manosa, arabinosa y

AX (xilosa+galactosa+manosa+arabinosa) extraídos en el medio líquido, expresados como se describe en la Ecuación 3-9.

$$\begin{aligned} &\text{Rendimiento de extracción de azúcares potenciales en el líquido del pre} \\ &\quad - \text{tratamiento alcalino} \\ &= \left(\frac{\text{gramos de azúcar extraídos en el líquido}}{\text{gramos de azúcar en la cascarilla de cebada}} \right) \times 100\% \end{aligned}$$

(3-9)

En la Figuras 3-4 a 3-7 se presentan las curvas obtenidas para el seguimiento de la reacción de los cuatro ensayos propuestos.

El ensayo grado severo-nivel bajo se dividió en tres etapas de acuerdo con el tiempo de reacción: 30 min, 2,5 y 10,5 horas. La primera etapa, correspondió al tiempo de residencia de 30 minutos contemplado inicialmente en el diseño experimental (Tabla 3-1). Sin embargo, a este tiempo, no se alcanzó una fase de equilibrio para la extracción de xilosa o arabinosa, mostrando que este tiempo no era suficiente para la extracción (notable tendencia de comportamiento lineal para estos dos azúcares). La segunda etapa se evaluó hasta 2,5 horas, a esta nueva condición se pierde la linealidad de la curva y se observó que la reacción comienza a estabilizarse para la extracción tanto de xilosa como de arabinosa (datos no mostrados), aunque aún no se logra definir claramente esta zona. En la última etapa, la reacción se dejó hasta las 10,5 horas, Figura 3-4.

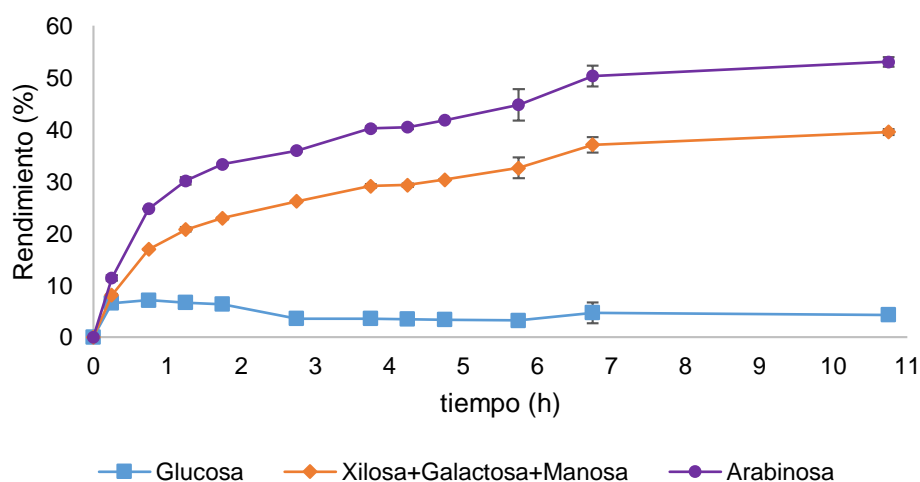


Figura 3-4. Rendimiento de extracción de los azúcares a través del tiempo para el ensayo grado severo, nivel bajo, a 10,5 horas de reacción

En la figura 3-4 se observó que la reacción sigue aumentando desde las 2,5 horas hasta aproximadamente las 6,5 horas, sin embargo, a partir de las 6,5 hasta las 10,5 horas se evidencio más claramente la zona de equilibrio. El máximo rendimiento de xilosa y arabinosa fue de 39,55 y 53,07% respectivamente. Para la glucosa se observó un punto máximo (7,15%), una zona de equilibrio y una ligera degradación a través del tiempo.

La Figura 3-5 presenta el seguimiento de la reacción para la extracción de los azúcares en el ensayo severo, nivel alto. A los 20 minutos de reacción se observa el punto máximo de extracción para la arabinosa (74,97%) y este se mantiene aproximadamente estable hasta las 2 horas, con una leve degradación en el tiempo final. El rendimiento máximo de xilosa se alcanzó a los 40 minutos con un porcentaje de 20,06% y posteriormente comenzó a degradarse hasta un rendimiento de 10% al final del periodo de extracción. La glucosa se extrajo muy poco, alcanzándose tan solo 1% de rendimiento máximo, valor que se reduce hasta el final del ensayo.

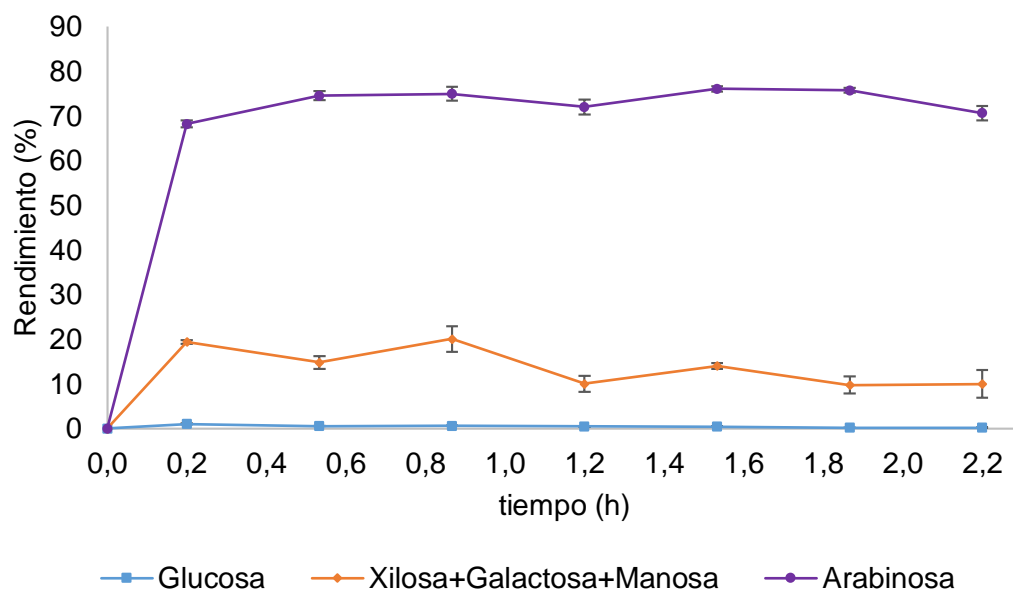


Figura 3-5. Rendimiento de extracción de los azúcares a través del tiempo para el ensayo grado severo, nivel alto a 2 horas de reacción

En la Figura 3-6 se observa el seguimiento para el ensayo moderado, nivel bajo. A las 2 horas de reacción empieza a observarse la estabilización de la curva de extracción tanto para la arabinosa como para la xilosa, el rendimiento máximo se obtuvo luego de 8 horas, encontrándose rendimientos semejantes para la xilosa y arabinosa: 54,02% y 51,11%, respectivamente. Después de este tiempo se observa una ligera degradación de los

azúcares. En cuanto a la glucosa se encontró un rendimiento máximo de 13,83% a las 2 horas de reacción. Posteriormente este azúcar se comienza a degradar, tal que el rendimiento se reduce aproximadamente hasta 9%.

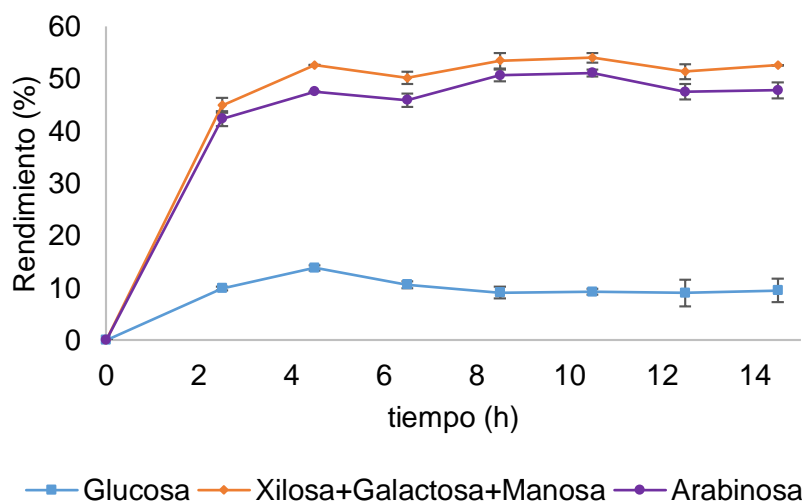


Figura 3-6. Rendimiento de extracción de los azúcares a través del tiempo para el ensayo grado moderado, nivel bajo a 12 horas de reacción

En la Figura 3-7 se observa el máximo rendimiento de extracción de xilosa+galactosa+manosa, arabinosa y glucosa a las 12 horas de reacción. Se alcanzó 63,92, 76,09 y 5,03% respectivamente. Después de este tiempo se observa una ligera degradación, que es mayor para la xilosa.

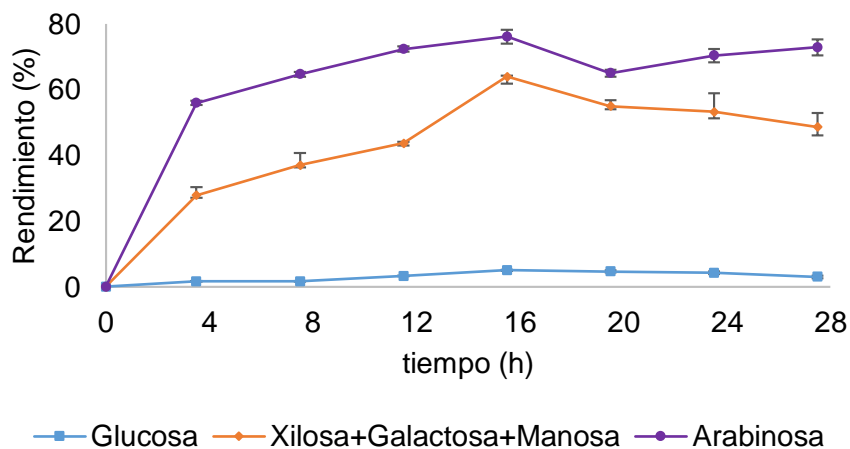


Figura 3-7. Rendimiento de extracción de los azúcares a través del tiempo para el ensayo grado moderado, nivel alto a 24 horas de reacción

En resumen, los resultados para la cinética de extracción de los xilo-oligosacáridos y gluco-oligosacáridos de la cascarilla de cebada pre-tratada con NaOH, se presenta la Figura 3-8. En esta figura se observa que el máximo rendimiento de gluco-oligosacáridos se obtuvo para el ensayo moderado, nivel bajo a las 2 horas de reacción con un porcentaje de 13,83%. El máximo rendimiento de xilo-oligosacáridos se obtuvo para el ensayo moderado nivel alto a las 12 horas de reacción con 64,81%, seguido del ensayo moderado nivel bajo con 53,04% a las 8 horas de reacción, aunque cabe destacar que desde las 2 horas se alcanzó un rendimiento del 50,92% para este mismo ensayo. Los rendimientos obtenidos para el ensayo severo, tanto nivel bajo como alto, estuvieron semejantes entre sí con porcentajes del 44,10 y 41,25% respectivamente, la diferencia entre ellos correspondió principalmente al tiempo: 10,5 horas para el ensayo severo-bajo y tan solo 40 minutos para el ensayo severo-alto.

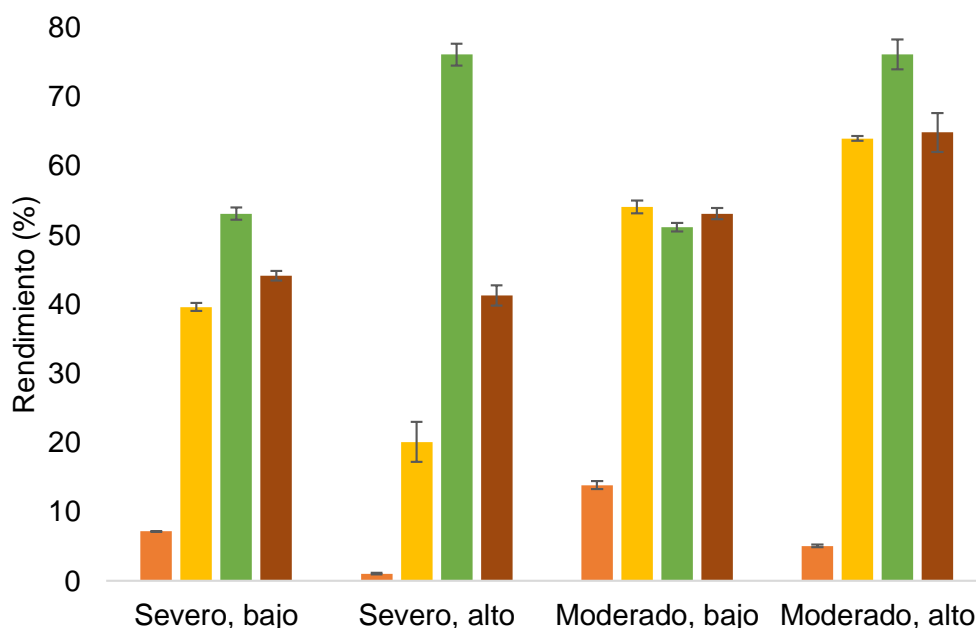


Figura 3-8. Rendimiento máximo de extracción de glucosa (barras naranjas), xilosa+galactosa+manosa (barras amarillas), arabinosa (barras verdes) y AX: suma de xilosa+galactosa+manosa+arabinosa (barras cafés)

Si se realiza un análisis de cada uno de los azúcares principales que componen a los xilo-oligosacáridos extraídos, se observa que para la xilosa la tendencia de una mayor extracción en el ensayo moderado-alto se conserva (63,92%), seguido del ensayo moderado-bajo (54,02%), pero se observa un cambio en el rendimiento en los ensayos a condiciones severas. La xilosa se recupera más en el ensayo a nivel bajo (39,55%) que en

el nivel alto (20,06%), lo que supone una mayor degradación de la xilosa extraída en el tratamiento realizado a una mayor temperatura (90°C). En cuanto al rendimiento de arabinosa se encontraron valores semejantes para los dos ensayos a nivel alto (76%) y valores semejantes para el nivel bajo (51-53%).

Las pérdidas observadas pueden ser causadas por la degradación de los carbohidratos debido al *peeling* y a las reacciones *stopping* hasta la formación de ácidos carboxílicos, reacciones que son similares durante el pulpeo alcalino (Sjöström, 1993; Laine et al., 2015). La degradación de los azúcares también puede deberse a las reacciones de Maillard que pueden ocurrir en el medio por la presencia de proteínas y azúcares reductores que se desencadenan por el calor y las condiciones ácidas/básicas del medio (Chiesa & Gnansounou, 2011).

Los resultados que se obtuvieron en esta etapa coinciden con lo reportado por Wilkinson et al. (2014), quienes encontraron una liberación de 259,6 mg de xilosa/g de biomasa luego de 12 horas de tratamiento a 50°C con una solución a 5% de NaOH y una relación de sólidos de 25% p/v. Laine et al., (2015) reportaron la extracción a condiciones de 20°C, 1 M NaOH por 1 h de los AX de la cascarilla de cebada, encontrándose en el líquido de extracción 6,6% de xilosa y 3,3% de arabinosa, principalmente como poli y oligosacáridos, lo que correspondió a un rendimiento inferior al 50%. Vieira et al., (2014) lograron remover hasta el 75-82% de los AX de la cascarilla de cebada con tres extracciones secuenciales usando soluciones de KOH desde 0,5 M, 1 M hasta 4 M por tiempos que podían variar entre 2 h a 40°C o 24 horas a temperatura ambiente.

El resultado del ANOVA, muestra que para la variable de respuesta rendimiento de xilosa (YXil), arabinosa (YARA), AX (YAX) y glucosa (YGlc) expresado en porcentaje, la interacción de segundo orden (grado*nivel*tiempo) fue altamente significativa (p-valor<0,05). Es decir, que los tres factores evaluados en el pre-tratamiento son dependientes e influyen en los cuatro rendimientos evaluados en el proceso de extracción (Anexo D).

El análisis de comparaciones múltiples se realizó por la prueba de Tukey-Kramer, este mostró que las diferencias entre medias para el rendimiento de xilosa fueron estadísticamente significativas solo para el ensayo moderado nivel alto. Para este los primeros tiempos: 0, 4 y 8 horas fueron iguales entre sí, pero diferentes de los tiempos 12,

16, 20 y 24 horas. Lo cual corrobora que el mayor rendimiento de xilosa se obtuvo a las 12 horas de reacción (tiempo 3), aunque estadísticamente el tiempo de las 16, 20 y 24 h son iguales respecto al tiempo de las 12 horas, ósea que después de las 12 horas el rendimiento no cambia significativamente y la reacción alcanzó su equilibrio.

Para el rendimiento de arabinosa la diferencia entre medias fue estadísticamente significativa solo para el ensayo severo nivel alto. En los restantes tres ensayos al menos se encontró una diferencia. Para el ensayo severo nivel bajo se encontró que el tiempo 0 versus el tiempo 10,5 h fue diferente de los demás (a tiempo de 10,5 h, se encontró el rendimiento máximo de arabinosa), para el ensayo moderado nivel bajo, se encontró que al menos el tiempo 0 fue diferente del tiempo 8 h (rendimiento máximo) y para el ensayo moderado nivel alto, se encontró que los tiempos 0, 4 y 16 h fueron iguales, pero estadísticamente diferentes de los tiempos (8, 12, 16, 20 y 24 h).

En cuanto al rendimiento de AX se encontró por la prueba de Tukey-Kramer que los ensayos a nivel bajo, tanto moderado como severo no fueron estadísticamente diferentes. En el ensayo severo alto se encontró al menos una diferencia de medias entre los tiempos 40 minutos y 2 horas, para el ensayo moderado nivel alto se encontraron tres zonas; el tiempo 0 y 4 horas fueron diferentes de los tiempos a las 12, 16 y 20 h y estos a su vez fueron diferentes de los tiempos 8 y 24 horas.

Para las diferencias entre medias para el rendimiento de glucosa, se encontró que solamente el ensayo moderado nivel bajo presento diferencias significativas en el tiempo, los tiempos 0 y 8 horas fueron iguales, pero diferentes del tiempo 2 y 6 horas y estos a su vez iguales pero diferentes del tiempo 10 y 12 horas.

Adicionalmente, en la Figura 3-9 (A), se presentan los rendimientos de xilosa en función de la temperatura y la concentración de NaOH. Los rendimientos máximos de xilosa se obtuvieron para las temperaturas más bajas (30 y 40°C) y las concentraciones de NaOH más altas (1,5 y 4M). El único rendimiento que estuvo por debajo de 40% correspondió a la temperatura más alta (90°C) y una concentración de NaOH de 1 M.

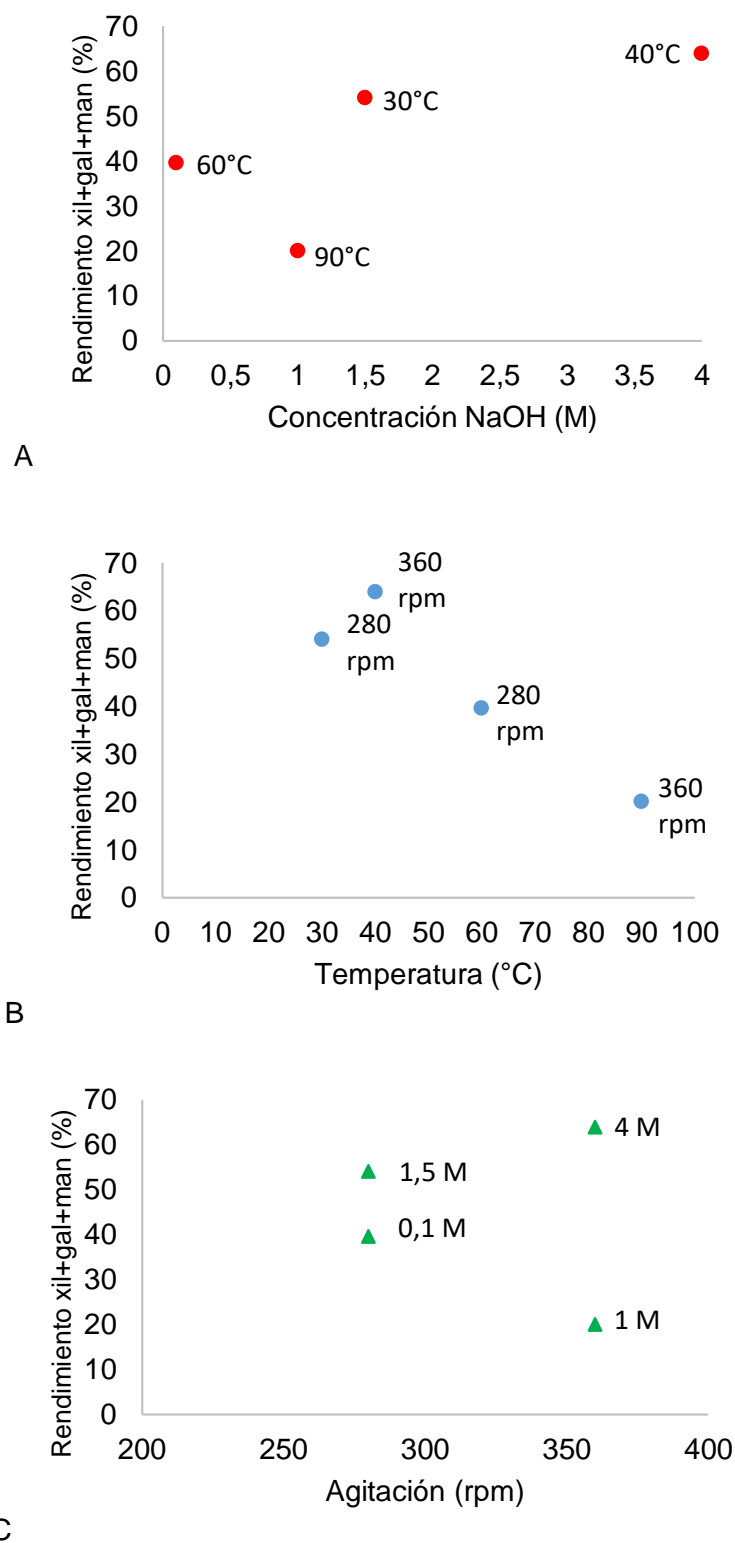


Figura 3-9. Rendimiento máximo de xil+gal+man en función de las variables del diseño experimental: concentración NaOH, temperatura y agitación

La relación entre la temperatura y la agitación, se muestra en la Figura 3-9 (B). Allí se evidencia que el mayor rendimiento de xilosa se encontró para la máxima velocidad de agitación 360 rpm a la temperatura de 40°C, aunque los valores intermedios se encontraron para la menor agitación (280 rpm) y las temperaturas intermedias (30 y 60°C). El valor mínimo de rendimiento correspondió a la máxima agitación: 360 rpm y la temperatura más alta (90°C).

Por último, en la Figura 3-9 (C) se muestra la correlación entre la concentración de NaOH y la agitación. Se observa que el máximo rendimiento se encontró para la máxima concentración de soda (4 M) y la máxima velocidad de agitación (360 rpm), mientras que los rendimientos intermedios se encontraron para la mínima agitación (280 rpm) y la concentración de NaOH mínima (0,1 M) e intermedia (1,5 M). El menor rendimiento se halló para la máxima agitación y la concentración de 1 M. Por lo tanto, la agitación no tiene un efecto significativo en estos resultados, si se compara con la concentración de la soda y la temperatura.

El comportamiento de estas tres variables en función del rendimiento de arabinosa y AX, se presentan en el Anexo E. De estas relaciones, puede concluirse que la liberación de arabinosa se ve favorecida a las condiciones más extremas de temperatura, agitación y concentración de NaOH, mientras que los AX presentan un comportamiento semejante a la xilosa.

3.3.3 Seguimiento de extracción de los grupos acetilo a través del tiempo

La hidrólisis alcalina además de extraer la hemicelulosa, también remueve efectivamente los grupos acetilo y las sustituciones de los ácidos urónicos de esta fracción. Por lo tanto, la superficie de la hemicelulosa se vuelve más accesible a las enzimas hidrolíticas.

En la Figura 3-10, se presenta la liberación de los grupos acetilo, expresados como ácido acético, a través del tiempo para los cuatro ensayos realizados. Comparando el ensayo severo y moderado a nivel bajo (ya que ambos presentan la misma carga de sólido), se observa que en el primero se logra extraer una mayor porción de los grupos acetilo de la hemicelulosa. Para el ensayo severo-bajo se obtiene un máximo de 0,63 g/L de ácido acético a los 45 minutos de reacción mientras que para el ensayo moderado-bajo 0,42 g/L

a las 2 horas de reacción. Por lo tanto, entre estos dos ensayos la temperatura tuvo una mayor influencia en la extracción de los grupos acetilo.

En cuanto a los ensayos a nivel alto, la mayor concentración se obtuvo para el ensayo severo, 1,02 g/L a las 2 horas de reacción, mientras que para el ensayo moderado fue 0,84 g/L a las 12 horas de reacción. De nuevo el efecto de la temperatura fue mayor que el de la concentración de NaOH para retirar un mayor porcentaje de los grupos acetilo, así como se encontró para el nivel bajo.

Para los ensayos del grado moderado tanto para el nivel bajo como alto se alcanzó a encontrar un equilibrio de la liberación de los grupos acetilo en los tiempos de reacción evaluados, mientras que para los ensayos a condiciones severas no se alcanzó una zona de equilibrio.

En el ensayo severo-alto se observó un incremento de la liberación de grupos acetilo con el tiempo, sin lograrse su estabilización luego de 2 horas. Para el ensayo severo-bajo, aunque se observó una estabilización de la curva desde los 45 minutos hasta las 5,5 horas, después de este tiempo se evidenció un aumento de liberación de los grupos acetilo hasta las 10,5 horas.

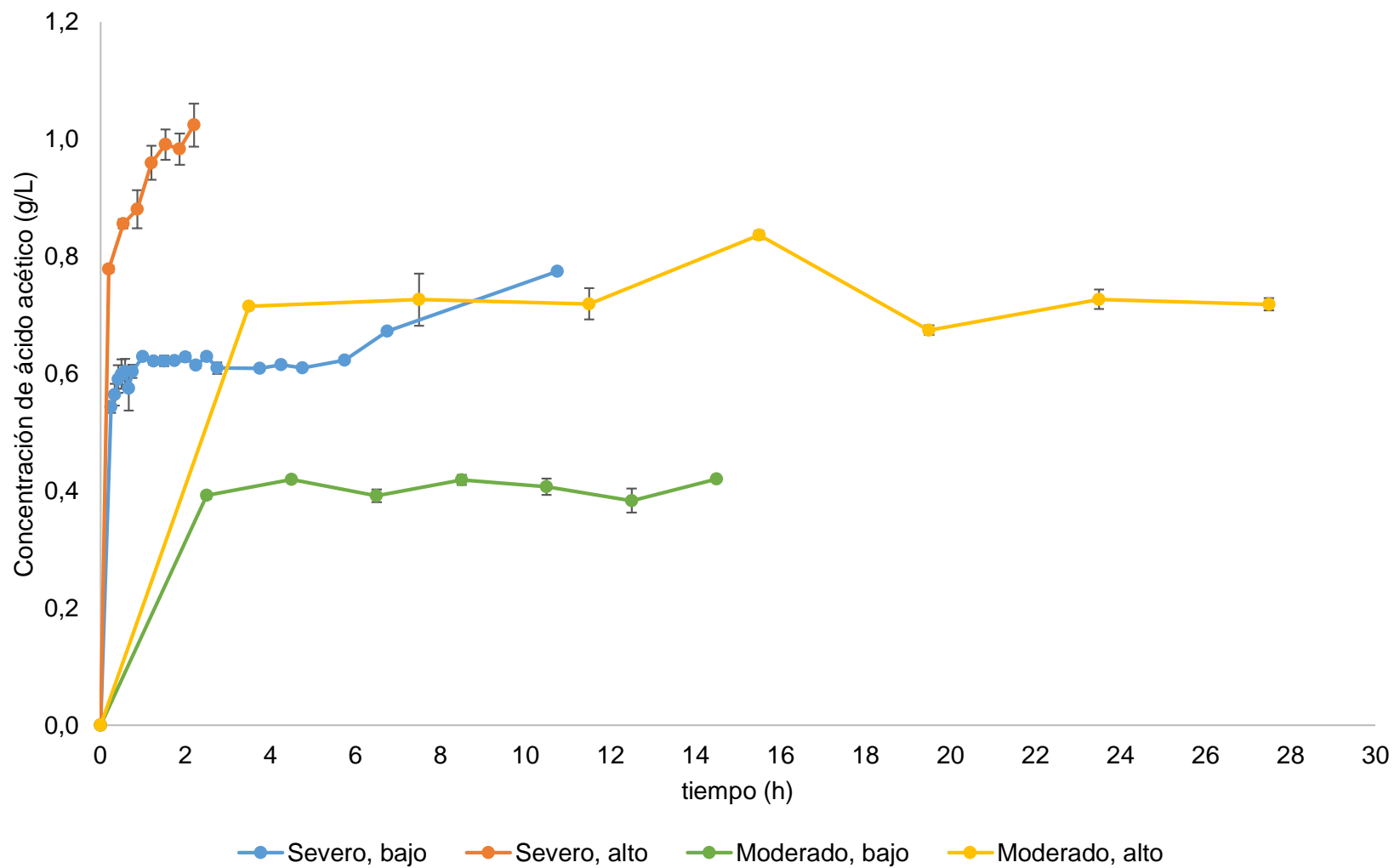


Figura 3-10. Cinética de la liberación de los grupos acetilo (expresados como ácido acético) extraídos

3.3.4 Cinética de extracción

En las Figuras 3-11 a 3-12 se presentan la concentración de los AX extraídos en el líquido de pre-tratamiento junto con las curvas ajustadas aplicando el modelo de Saeman, para los cuatro ensayos realizados. En el Anexo F se presentan, adicionalmente, las curvas y el ajuste para los azúcares monoméricos por separado: xilosa y arabinosa. El mejor ajuste para el modelo de Saeman se obtuvo minimizando la suma de los cuadrados del error ($\sum(C_m - C_p)^2$).

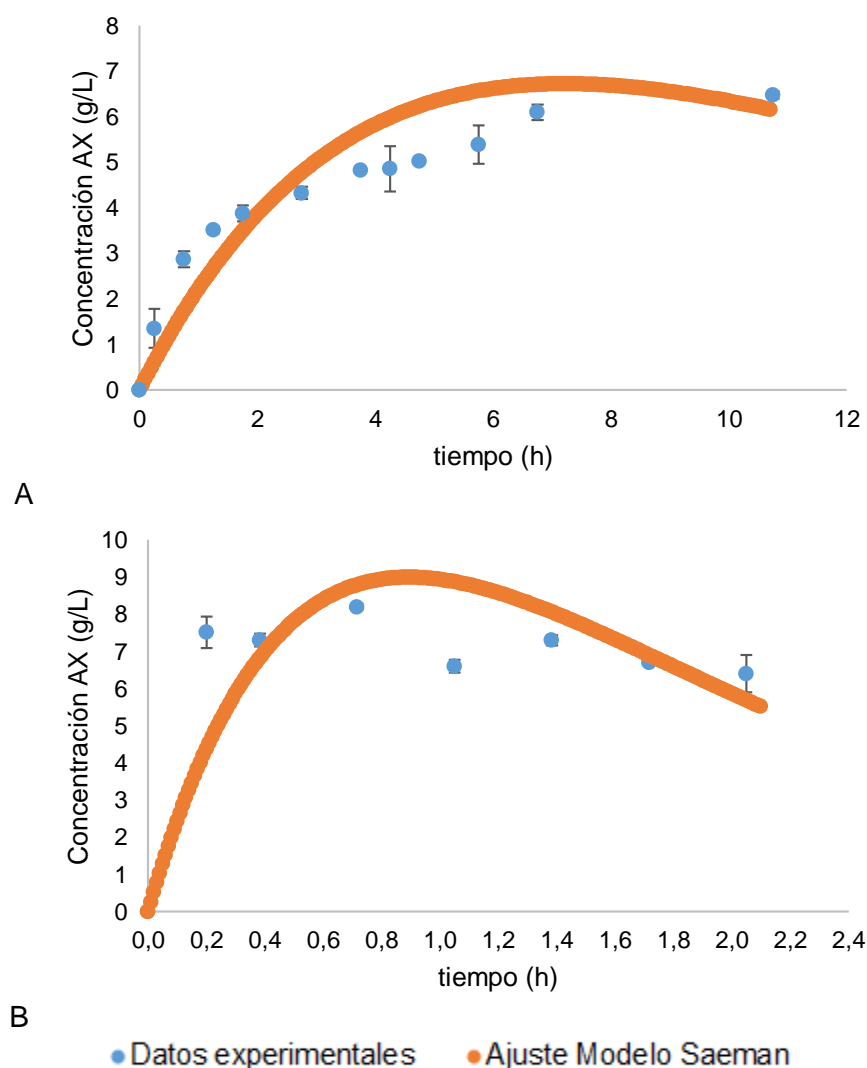


Figura 3-11. Datos experimentales de la concentración de AX extraídos en el líquido de pre-tratamiento y datos predichos por el modelo de Saeman para los ensayos (A) Severo nivel bajo y (B) Severo nivel alto

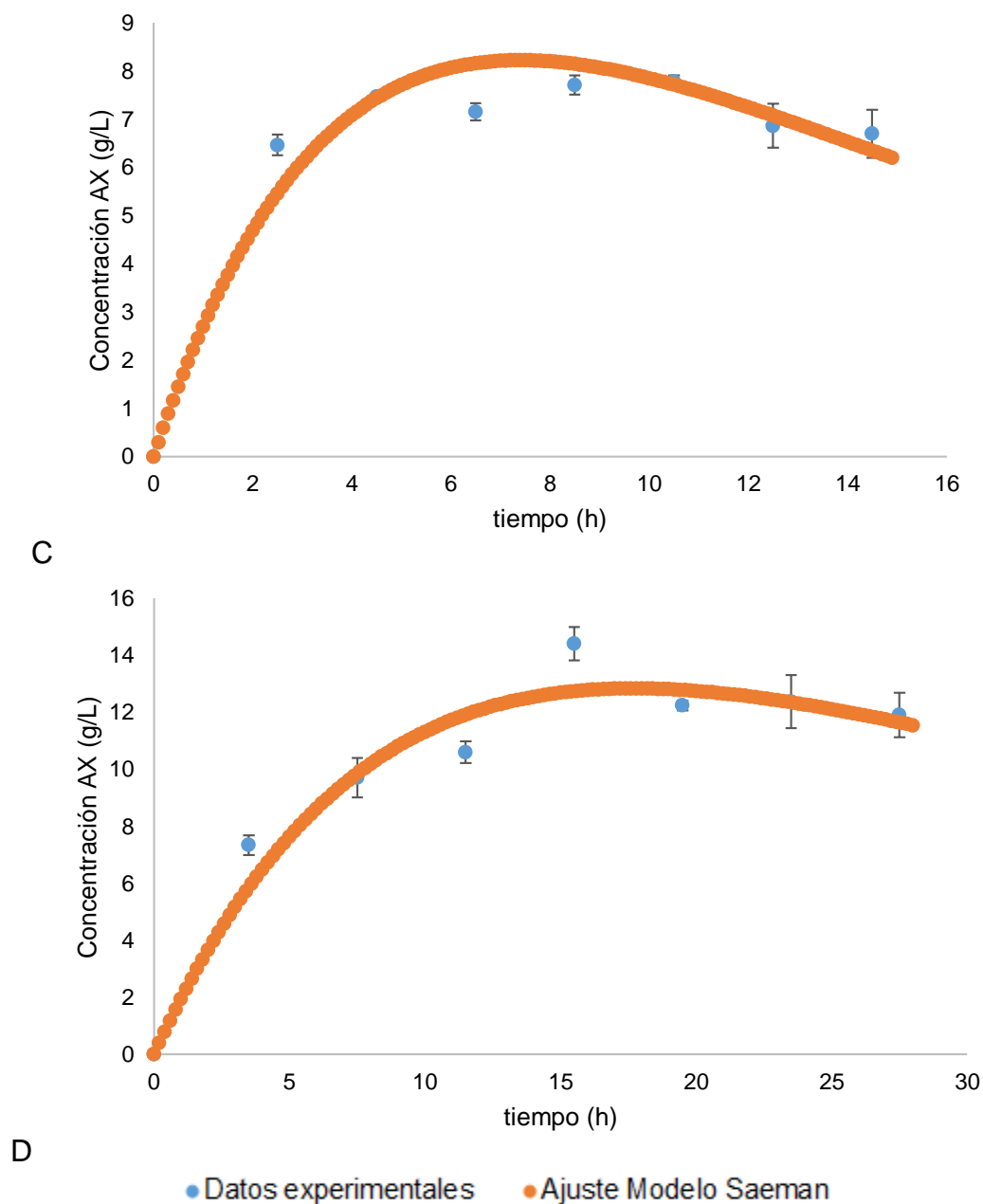


Figura 3-12. Datos experimentales de la concentración de AX extraídos en el líquido de pre-tratamiento y datos predichos por el modelo de Saeman para los ensayos (C) Moderado nivel bajo y (D) Moderado nivel alto

En la Tabla 3-7, se presenta el resumen de los valores de las constantes cinéticas obtenidas y el error del ajuste del modelo de Saeman a los datos experimentales. Para los AX, xilosa+galactosa+manosa y arabinosa, así como el tiempo al cual el modelo de Saeman, predice el mayor rendimiento de extracción.

Tabla 3-7. Constantes de la velocidad de reacción, error y tiempo máximo de rendimiento predichos para el modelo de Saeman

Nomenclatura del ensayo	Severo						Moderado					
	Bajo			Alto			Bajo			Alto		
Tipo de azúcar/ Constantes cinéticas	k ₁	k ₂	tiempo (h)	k ₁	k ₂	tiempo (h)	k ₁	k ₂	tiempo (h)	k ₁	k ₂	tiempo (h)
AX	0,17	0,11	7,15	1,26	0,97	0,88	0,20	0,08	7,40	0,09	0,03	17,60
Xilosa+galactosa+manosa	0,15	0,12	7,35	1,20	2,50	0,56	0,20	0,08	7,60	0,07	0,03	21,00
Arabinosa	0,22	0,09	6,95	3,02	0,25	0,89	0,19	0,09	7,70	0,24	0,01	13,60

La ecuación de Arrhenius para los AX extraídos en el pre-tratamiento alcalino se ajustaron a una línea recta como se observa en la Figura 3-13, a excepción de la temperatura de 30°C.

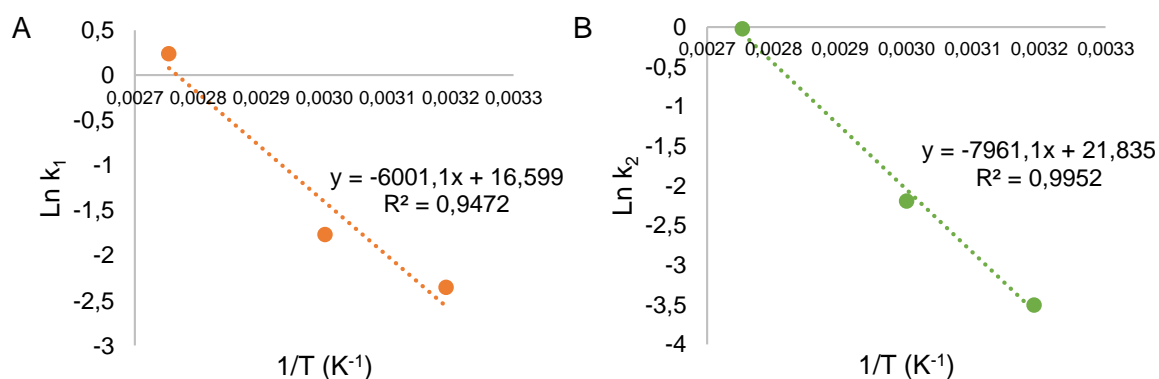


Figura 3-13. Ajuste de la ecuación de Arrhenius para las constantes cinéticas (A) k_1 y (B) k_2 encontradas con el modelo de Saeman para la extracción de los AX mediante el pre-tratamiento alcalino a las temperaturas 40, 60 y 90°C

En la Tabla 3-8 se presenta el resumen de la energía de activación y del factor pre-exponencial de la ecuación de Arrhenius para tres de los cuatro ensayos propuestos. Aunque los datos para el ensayo moderado nivel bajo a 30°C se ajustaron al modelo de Saeman, sus constantes cinéticas no se pudieron linealizar para obtener los parámetros de la ecuación de Arrhenius. La mayor energía de activación se obtuvo para la xilosa en comparación con la arabinosa y la tendencia mostro que k_2 fue superior a k_1 . El conocimiento de la termodinámica y cinética de reacciones es necesaria para la comprensión físico-química de los procesos catalíticos, así el valor de las constantes

cinéticas predichas en los modelos es esencial para el diseño adecuado del reactor y el proceso (Murzin, 2013).

Tabla 3-8. Energía de activación para cada tipo de azúcar extraído en el pre-tratamiento alcalino, mediante la ley de Arrhenius a las temperaturas 40, 60 y 90°C

Tipo de azúcar	Constantes cinéticas	Ea (KJ mol ⁻¹)	Ln Ai	R ²
AX	k ₁	49,89	16,60	0,95
	k ₂	66,19	21,83	1,00
Xilosa+galactosa+manosa	k ₁	55,46	18,42	0,97
	k ₂	83,40	28,38	0,98
Arabinosa	k ₁	50,21	17,39	0,79
	k ₂	58,49	18,19	0,93

3.3.5 Extracción de proteína

En la Figura 3-14 se presenta la caracterización de la fracción de proteína total para la cascarilla de cebada original y pre-tratada con NaOH al tiempo final de cada ensayo. Como se observa, el tratamiento con NaOH fue efectivo en remover la proteína de la cascarilla de cebada residual del proceso cervecero, para todos los ensayos evaluados. Para el ensayo severo nivel bajo se obtuvo el mayor contenido de proteína residual después del pre-tratamiento, con valor de 3,7% a las 10,5 h. Para el ensayo severo nivel alto y moderado nivel bajo se obtuvieron porcentajes de proteína semejantes de 2,4 y 2,5% a las 2 y 12 h respectivamente. Para el ensayo moderado nivel alto se obtuvo el menor porcentaje de proteína 1,9% en la biomasa pre-tratada a las 24 h de reacción. Los cuatro tratamientos fueron efectivos en extraer las proteínas y no se observaron diferencias significativas entre ellos. Podría destacarse el segundo ensayo a condiciones severas-altas en donde en tan solo dos horas se alcanzó un alto porcentaje de extracción, semejante al resto de ensayos, solo que estos tardaron 10 horas o más.

Vieira et al. (2014) lograron extraer el 82-85% de las proteínas totales de la cascarilla de cebada en un proceso integrado mediante etapas secuenciales de extracción alcalina, incrementado la concentración de soda desde 0,1 M, 0,5 M hasta 4 M por 24 horas de reacción a temperatura ambiente. De manera semejante, Laine et al., (2015) reportó que la cascarilla de cebada sin pre-tratamiento tenía un contenido total de 22,5% de proteínas y después del pre-tratamiento alcalino con 1 M NaOH por 1 hora a temperatura ambiente este valor disminuyó a 1,8%.

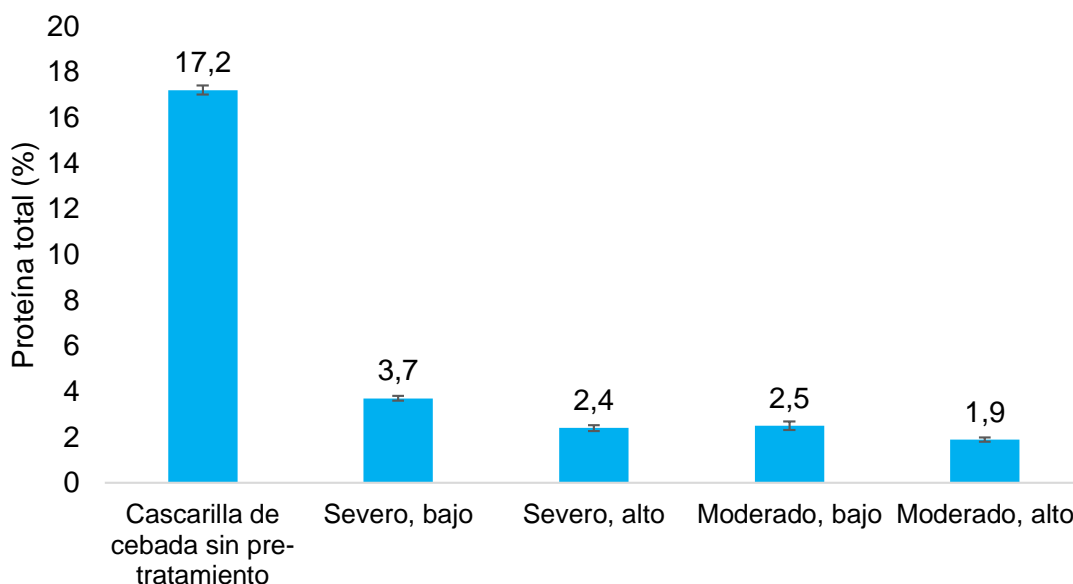


Figura 3-14. Proteína total en base seca de la biomasa original y después del pre-tratamiento con NaOH

Industrialmente, los cereales se han usado para la producción de almidón. El tratamiento acuoso elimina el almidón del cereal y deja la proteína insoluble, como el gluten en el trigo. Las proteínas de los cereales son ricas en aminoácidos que contienen azufre. La presencia de estos aminoácidos resulta en la formación de enlaces de disulfuro entrecruzados que disminuyen la solubilidad de la proteína, el uso de catalizadores alcalinos rompe estos enlaces, los aminoácidos neutros y ácidos se ionizan a este pH alcalino, incrementado así la solubilidad de las proteínas. Por ejemplo, un tratamiento a pH 8,5 (55°C) durante toda la noche solubilizó el 40% del gluten de la proteína de trigo. Cuando el pH se incrementó a 10, pudo solubilizarse hasta el 85% de las proteínas del gluten de trigo (Sari, Mulder, et al., 2015), como sucedió en estos ensayos.

3.3.6 Cuantificación de compuestos derivados del furano y fenólicos

En la Figura 3-15 se presenta el mecanismo de reacción para el tratamiento alcalino. En este los radicales hidroxilo formados en la mezcla atacan los enlaces α -bencilo éter entre la lignina y la hemicelulosa a través del agrietamiento oxidativo. Esto inicia el rompimiento del complejo lignocelulolítico, lo que conlleva posteriormente a mayores rendimientos en la hidrólisis enzimática. Como se observa en la Figura 3-15, los compuestos fenólicos más

significativos que se obtienen del ataque de los radicales hidroxilos en la biomasa son el ácido p-cumárico y ferúlico.

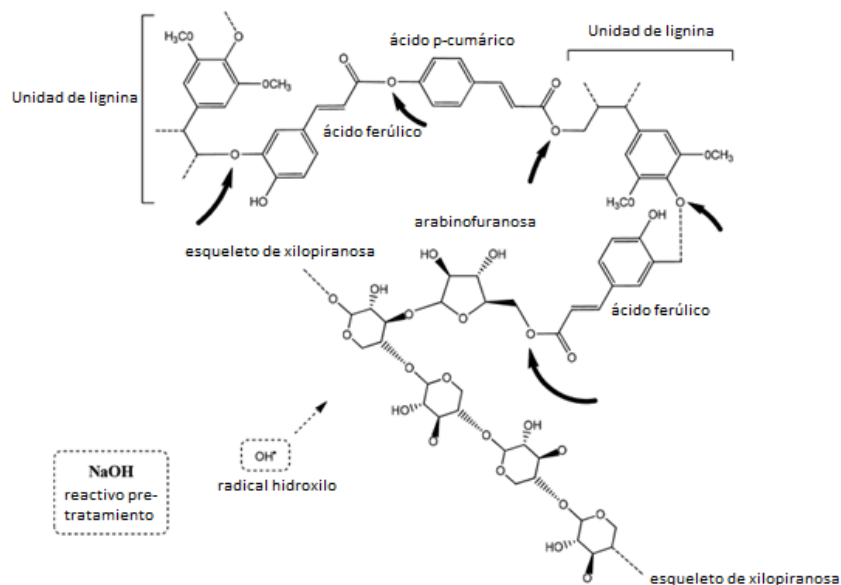


Figura 3-15. Puntos de ataque propuestos (\blacksquare) de los radicales de hidroxilo en la descomposición de las estructuras lignocelulósicas presentes en la cascarilla de cebada durante el pretratamiento alcalino

“Reproducido de Industrial Crops and Products, autores: Stuart Wilkinson, Katherine A. Smart, David J. Cook, Optimisation of alkaline reagent based chemical pre-treatment of Brewers spent grains for bioethanol production, página 220, Copyright 2018, con permiso de Elsevier [4340980506103]”

La caracterización de los inhibidores de fermentación para los cuatro ensayos se muestra en la Tabla 3-9. Se observa que de los tres grupos principales de inhibidores formados, el ácido acético es el de mayor porcentaje (73-83% del total). Le siguen los compuestos fenólicos con un porcentaje de liberación del 17 al 26% y en último lugar los derivados del furano con un 0,5% como máximo. Cabe destacar que el ensayo que más libera compuestos potencialmente inhibidores de fermentación es el severo-alto, seguido de los ensayos severo-bajo y moderado-alto. El ensayo que menos compuestos inhibidores de fermentación generó fue el ensayo moderado-bajo, lo cual demuestra que el efecto de la temperatura es la variable que mayor influye en la liberación de este tipo de compuestos en el pre-tratamiento alcalino, incluso sobre la concentración de NaOH.

Tabla 3-9. Concentración de compuestos inhibidores en ppm: ácido acético, derivados del furano y compuestos fenólicos a tiempo final del pre-tratamiento con NaOH

Nomenclatura		Severo			Moderado	
		Bajo (0,5h)*	Bajo (2,5h)*	Alto (2h)	Bajo (12h)	Alto (24h)
Ácidos alifáticos	Ácido acético	600±40	630±19	1020±80	420±7	720±20
Derivados del furano	HMF	n.d.	n.d.	1,44±0,82	n.d.	n.d.
	Furfural	n.d.	n.d.	6,39±2,40	0,24±0,04	13,61±3,39
Compuestos fenólicos	Ácido 4-hidroxibenzoico	0,41±0,03	1,52±0,07	1,75±0,42	0,88±0,04	1,53±0,08
	4-Hidroxibenzaldehído	0,97±0,04	1,70±0,04	3,53±0,20	1,21±0,04	1,83±0,10
	Ac. Vainillínico	0,96±0,06	2,48±0,09	4,48±0,88	2,46±0,12	4,01±0,24
	Vainillina	0,22±0,05	0,73±0,03	8,91±0,66	1,12±0,01	0,85±0,01
	Ac. Siríngico	1,47±0,05	2,60±0,06	n.d.	3,33±0,33	2,98±0,15
	Siringaldehído	3,10±0,07	5,17±0,05	2,05±0,29	3,55±0,16	3,27±0,10
	Ácido p-cumárico	16,04±0,13	42,78±0,63	122,69±7,58	43,61±1,06	55,17±2,23
	Ácido ferúlico	102,10±3,06	170,32±1,82	224,06±19,51	78,29±1,88	69,48±3,46
Total (ppm)		727,63	859,45	1394,00	554,68	875,62

*Para el ensayo severo-nivel bajo, se tiene solamente el reporte para las dos primeras etapas de reacción (0,5 y 2,5 h).

Dentro de los ácidos hidroxicinámicos, el ferúlico y p-cumárico fueron los más representativos. En la Figura 3-16 se presentan las concentraciones finales obtenidas para estos dos ácidos en los cuatros ensayos realizados. Comparando los resultados alcanzados al nivel bajo (misma carga de sólidos), se encontró casi la misma liberación de ácido p-cumárico tanto para el grado severo como moderado. Para el ácido ferúlico si se observaron diferencias significativas. Por ejemplo, en cuanto al efecto de la temperatura, hubo mayor liberación de ácido ferúlico para el grado severo que para el grado moderado (90 vs 30°C). En el ensayo severo-alto, se encontró la mayor liberación de ácido p-cumárico y ferúlico, lo cual indica que el efecto de la temperatura tuvo mayor repercusión en la escisión de estos compuestos, siendo aún mayor que el efecto de la soda. De manera general, el grado severo tuvo mayor influencia en la liberación de los ácidos p-cumárico y ferúlico sobre el grado moderado, mostrándose una mayor liberación del ácido ferúlico que del cumárico.

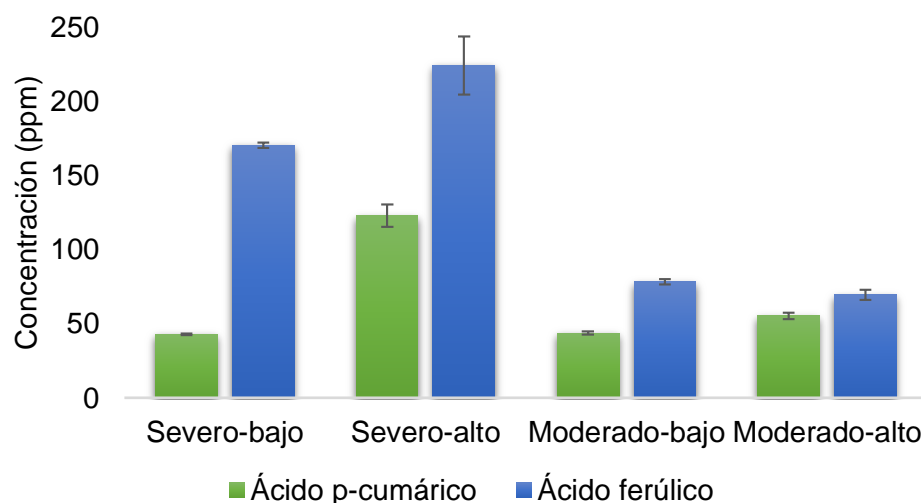


Figura 3-16. Concentración de ácido p-cumárico y ferúlico liberados a tiempo final del pre-tratamiento con NaOH

En las Figuras 3-17 y 3-18 se esquematiza el seguimiento de la liberación de ácido p-cumárico y ferúlico a través del tiempo para los ensayos grado severo nivel bajo (segunda etapa de reacción, 2,5 horas) y nivel alto (2 h). En estas figuras se observan claramente dos zonas, para el ensayo severo nivel bajo: del tiempo cero a la primera hora de reacción la velocidad de extracción del ácido p-cumárico y ferúlico es rápida, mientras que después de la primera hora, se alcanza una zona de estabilización. En el ensayo severo-nivel alto la reacción se estabiliza después de los 20 minutos.

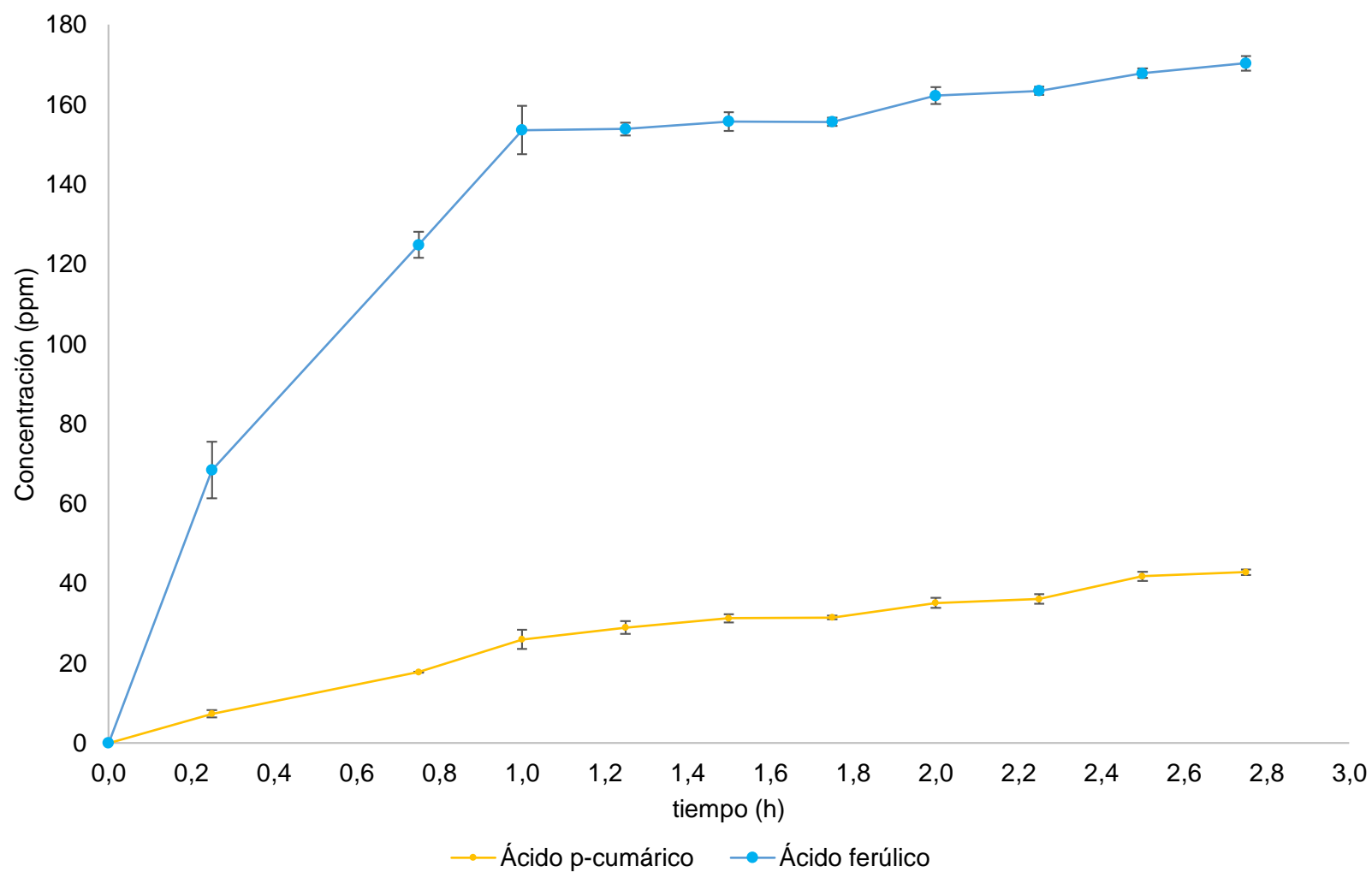


Figura 3-17. Cinética de liberación de ácido p-cumárico y ferúlico a través del tiempo para el ensayo grado severo, nivel bajo por 2,5 horas de reacción

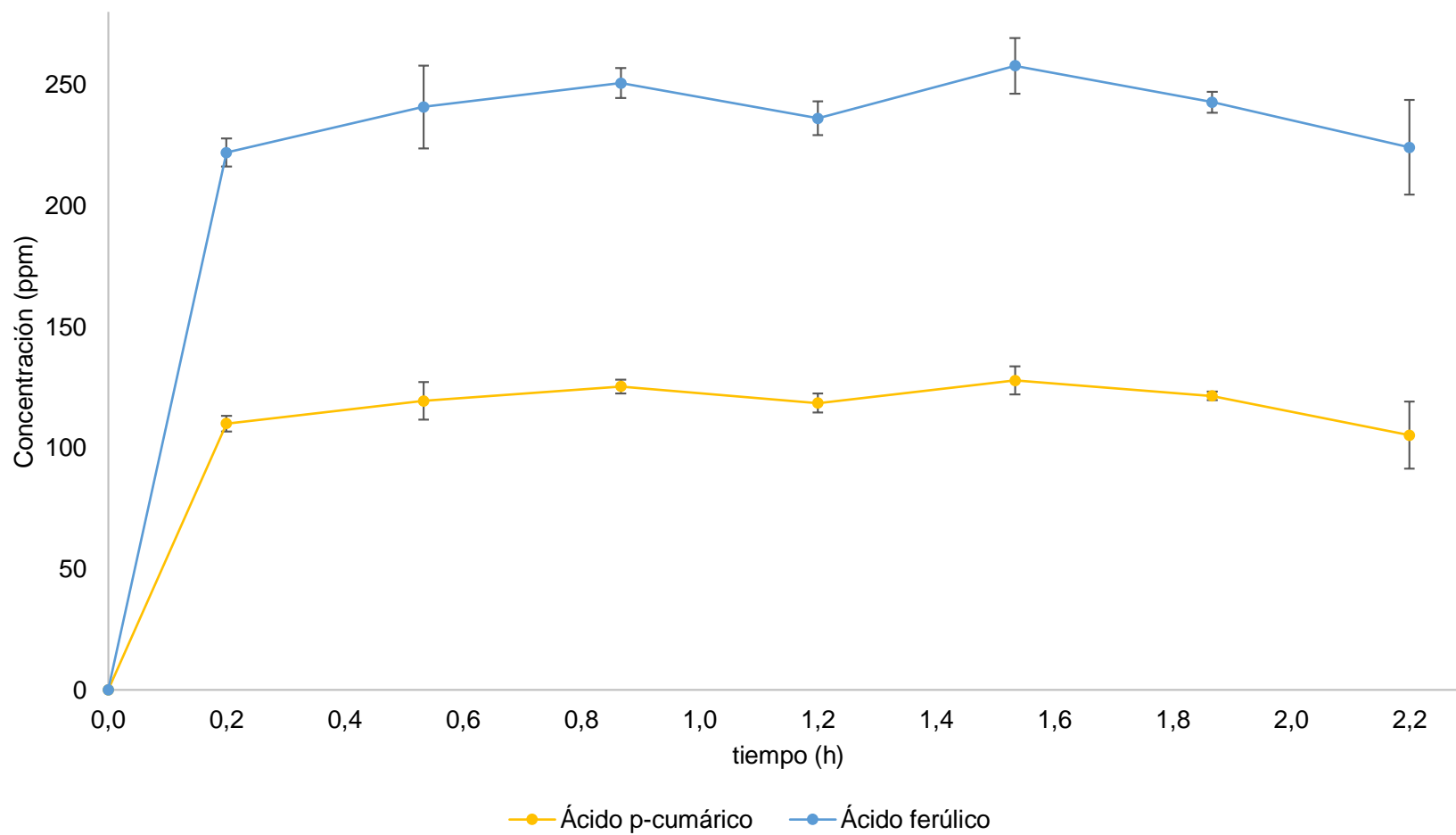


Figura 3-18. Cinética de liberación de ácido p-cumárico y ferúlico a través del tiempo para el ensayo severo, nivel alto por 2 horas de reacción

El ácido ferúlico (4-hidroxi-3-metoxi-ácido cinámico) y el ácido p-cumárico (ácido 4-hidroxicinámico) son los ácidos fenólicos más abundantes en la cascarilla de cebada (Bartolomé, Santos, Jime, Nozal, & C., 2002). La extracción de estos compuestos de alto valor agregado abre nuevas posibilidades para el uso de la cascarilla de cebada. El contenido de ácido ferúlico en la cascarilla de cebada puede variar de 0,17 a 0,24% en peso seco, mientras que el ácido p-cumárico fluctúa entre 0,068-0,121% (Bartolomé et al., 2002).

Por ejemplo, el ácido ferúlico tiene propiedades como antioxidante natural, agente antimicrobiano y preservante para los alimentos, presenta efectos antiinflamatorio, fotoprotectante, y precursor de sabores en los alimentos, mientras que el ácido p-cumárico tiene propiedades químico protectantes y antioxidantes (Bartolomé et al., 2002; Mussatto, Dragone, & Roberto, 2007), lo que plantea que la extracción de este tipo de compuestos tiene un alto potencial de valorización de la cascarilla de cebada utilizando este pre-tratamiento dentro del concepto de una biorrefinería.

Mussatto, Dragone, & Roberto, (2007), reportaron la liberación de 138,8 mg/L de ácido p-cumárico y 145,3 mg/L de ácido ferúlico en el tratamiento de la cascarilla de cebada a condiciones de NaOH al 2%, 120°C y 90 min. La concentración máxima de ácido ferúlico que se encontró en otra biomasa como la paja de arroz después de un pre-tratamiento alcalino con NaOH 4 M a 120°C y 2 horas de reacción fue de 4,091 g/L, en este análisis la variable temperatura y tiempo fueron las más significativas (Mohd Salleh, Mohamed Daud, Arbain, Ahmad, & Ku Ismail, 2011), lo que también se corroboró en este estudio.

3.3.7 Caracterización del material pre-tratado WIS

Los WIS se caracterizaron tanto para el tiempo en que se encontró el máximo rendimiento de extracción de los AX, como para el tiempo final de la reacción (Tabla 3-10). De manera general, para los cuatro ensayos a los dos tiempos evaluados, se observó que la celulosa se concentra de mayor forma para los dos ensayos realizados en el nivel alto, siendo a su vez mayor la concentración de la celulosa para el ensayo grado moderado (57,39%), seguido del grado severo (48,91%) y de los dos ensayos a nivel bajo (37,67 y 27,75% respectivamente). Sin embargo, se observa que para el ensayo moderado-alto hay una degradación a las 24 horas de reacción respecto al tiempo correspondiente al punto

máximo de extracción: 52 contra 57% de celulosa. El incremento de la celulosa en los restantes ensayos fue ligeramente superior para el tiempo final respecto al punto máximo.

Para la fracción de hemicelulosa expresada como suma de xilano y arabinano, se evidencia que la fracción de xilano se incrementa ligeramente (19,66%) para el ensayo severo-bajo respecto al contenido de xilano en la cascarilla de cebada sin procesamiento (16,21%). Para los demás ensayos se observa disminución de esta fracción tanto al tiempo de máxima extracción como al tiempo final. Lo cual ratifica el orden de los ensayos en lograr una mayor extracción de los AX de la cascarilla sin procesamiento, ya que la cascarilla sometida a las condiciones moderadas es la que presenta en su composición final una menor concentración de esta fracción en comparación con los ensayos a condiciones severas.

El componente de arabinanos también disminuye en el sólido pre-tratado respecto al sólido original observándose la misma tendencia de los xilanos, aunque el efecto del tiempo si afectó más la extracción de esta fracción. El ensayo en el que se observa una mayor cantidad remanente de arabinosa corresponde al grado severo-nivel alto. Los restantes cuatro ensayos a tiempo final quedan casi desprovistos de arabinosa en su composición.

La lignina ácido insoluble tiende a concentrarse en mayor proporción para los ensayos a nivel bajo. En el tiempo final la fracción de la lignina disminuye respecto al valor original de la materia prima sin procesamiento para los ensayos: severo-alto (5,71%), moderado bajo (9,12%) y alto (9,97%). El único ensayo en donde la lignina se concentra tanto en el tiempo de mayor extracción como en el tiempo final corresponde al ensayo severo-bajo. El menor valor se obtuvo para el ensayo severo-alto donde la temperatura tuvo un mayor efecto sobre la extracción de los compuestos fenólicos, como se observó en la Figura 3-16.

El pre-tratamiento con NaOH es muy efectivo en remover los grupos acetilo de la hemicelulosa, ya que después de la caracterización de los WIS en ninguno de los cuatro ensayos se registró la presencia de ácido acético, lo cual establece que el enlace acetato ya no está presente en la fracción de la hemicelulosa, como también lo describió Mandalari et al., (2005) en sus resultados con KOH 4M también sobre cascarilla de cebada. Las cenizas a tiempo final se mantuvieron constantes respecto a la biomasa de partida.

El análisis de covarianza para el porcentaje de celulosa, hemicelulosa, lignina ácido insoluble, indicó que la interacción de primer orden (grado*nivel) fue estadísticamente

significativa ($p < 0,05$) para todas las fracciones. Por lo tanto, el porcentaje de celulosa, hemicelulosa y lignina ácido insoluble del material pre-tratado depende de si el grado es severo o moderado y si el nivel es alto o bajo. En cuanto a la proteína los dos factores por aparte, grado y nivel fueron estadísticamente diferentes de cero ($p < 0,05$), mientras que su interacción no (Anexo G).

Sin embargo, las co-variables porcentaje de celulosa, hemicelulosa y lignina inicial en la cascarilla de cebada, no fueron estadísticamente diferentes de cero ($p > 0,05$); es decir, el valor inicial del porcentaje de estas fracciones no afectó el valor final de celulosa, hemicelulosa o lignina ácido insoluble de la biomasa después del pre-tratamiento. Aunque solamente para el porcentaje de celulosa, se encontró una contribución inversa (-0,65%) entre el valor final y el valor inicial

La prueba de diferencias entre medias arrojó por la comparación de Scheffe que la variable de respuesta porcentaje de celulosa en la interacción grado por nivel es diferente para el ensayo severo nivel bajo en comparación con los otros tres ensayos. También es diferente para el ensayo severo entre los niveles y es diferente para el nivel bajo entre los grados. Para el porcentaje de hemicelulosa se encontró que solamente el ensayo severo-nivel alto y moderado nivel-bajo presentaron entre si homogeneidad de grupos, el resto de ensayos son diferentes entre sí. En cuanto a la lignina ácido insoluble, se evidencio que el único ensayo diferente fue el denominado severo nivel bajo en comparación con los otros tres ensayos, aunque entre niveles hubo diferencias en los grados y entre el grado severo hubo diferencias en el nivel .

Tabla 3-10. Caracterización WIS después del pre-tratamiento con NaOH a tiempo de rendimiento máximo y tiempo final de pre-tratamiento

Nomenclatura		Cascarilla de cebada pre-tratada con NaOH a tiempo de rendimiento máximo de extracción de AX				Cascarilla de cebada pre-tratada con NaOH a tiempo final del pre-tratamiento			
		Severo		Moderado		Severo		Moderado	
		Bajo*	Alto	Bajo	Alto	Bajo*	Alto	Bajo	Alto
Condi-	T (°C)	60	90	30	40	60	90	30	40
	t (h)	10,5	0,7 (40 min)	2	12	10,5	2	12	24
Componentes (%)	Celulosa	27,8±0,5	48,9±0,6	37,7±0,08	57,4±0,82	27,8±0,5	52,6±0,8	40,6±2,1	52,2±0,8
	Hemicelulosa	25,3±0,6	16,3±0,9	20,1±0,04	12,5±0,98	25,3±0,6	16,9±0,5	15,5±0,6	10,2±0,2
	Xilano+Galactano+Manano	19,7±0,3	12,7±0,5	14,2±0,07	10,3±1,07	19,7±0,3	15,9±0,5	14,3±0,4	9,5±0,2
	Arabinano	5,7±0,4	3,6±0,5	5,9±0,03	2,5±2,3	5,6±0,4	1,01±0,02	1,2±0,2	0,7±0,01
	Lignina Ácido Insoluble	19,0±0,08	14,3±0,5	18,1±0,05	12,2±0,9	18,9±0,08	5,7±0,7	9,1±2,4	10,0±0,3
	Grupos acetilo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Proteína total	3,7±0,2	-	-	-	3,7±0,2	2,4±0,3	2,5±0,4	1,9±0,2
	Cenizas totales	4,2±0,1	6,6±0,3	3,9±0,11	4,1±0,2	-	-	-	-
	Total	79,8	88,5	82,2	88,1	79,8	84,17	71,6	78,34

*El tiempo final correspondió también al tiempo máximo de extracción de los AX para el ensayo severo, bajo (10,5h)

3.3.8 Análisis SEM

En la Figura 3-19 se presentan las micrografías realizadas por SEM a la cascarilla de cebada sin pre-tratamiento y a la cascarilla de cebada sometida a los cuatros pre-tratamiento alcalinos, descritos previamente. Todas las muestras se analizaron al tiempo final de cada ensayo y cabe destacar que la cascarilla de cebada tenía un tamaño de partícula promedio de 501,2 μm antes del pre-tratamiento. La cascarilla de cebada sin pre-tratamiento exhibe rigidez y unas fibrillas altamente ordenadas, con una morfología que presenta huecos o porosidades fuertemente pronunciados en su superficie, Figura 3-19 (A), Kim, Taylor, & Hicks, (2008) analizaron los cascos de cebada y describen que este material tiene muchos fitolitos, que son cuerpos de silicio resistentes a la descomposición que protegen las fibras contra la biodegradación, como también se observa en la cascarilla de cebada sin pre-tratamiento. La eliminación de la hemicelulosa y la proteína modifica la estructura del material, pero la estructura principal no se rompe, Figura 3-19 (B, C, D y E).

Durante el pre-tratamiento alcalino, aparte de la extracción de la lignina y proteína en el líquido de pre-tratamiento, algo de la lignina se solubiliza también en el líquido como se corroboró con la determinación de los compuestos fenólicos extraídos (Figura 3-16). Por lo tanto, los WIS quedan concentrados mayoritariamente en celulosa y en menor proporción en lignina (Tabla 3-10). En consecuencia, la estructura de la cascarilla de cebada se modifica fuertemente como se observa en la Figura 3-19 (B, C, D y E) en comparación con la Figura 3-19 (A).

La eliminación de la lignina permite a su vez la separación de las fibras de celulosa, como puede visualizarse en la Figura 3-19 (C) (ensayo severo nivel alto), donde la lignina residual del sólido pre-tratado fue la más baja de los cuatro ensayos 5,71%. En los tres últimos ensayos Figura 3-19 (C, D y E) donde se logró obtener un material con un 40-52% de composición de celulosa, se observa que las fibras de celulosa se logran separar de la estructura inicial y quedan completamente expuestas, aumentado así su área superficial externa, resultado semejante al encontrado por Mussatto, Dragone, & Rocha, (2006) sobre la misma biomasa y con un pre-tratamiento de pulpeo alcalino. En consecuencia, estas fibras serían más susceptibles de un ataque enzimático en comparación con la cascarilla de cebada sin procesar o con el material pre-tratado en el ensayo severo nivel alto, que

solo logra concentrar un 27% de celulosa después del pre-tratamiento, como también lo describe Liu et al., (2018) para rastrojos de maíz.

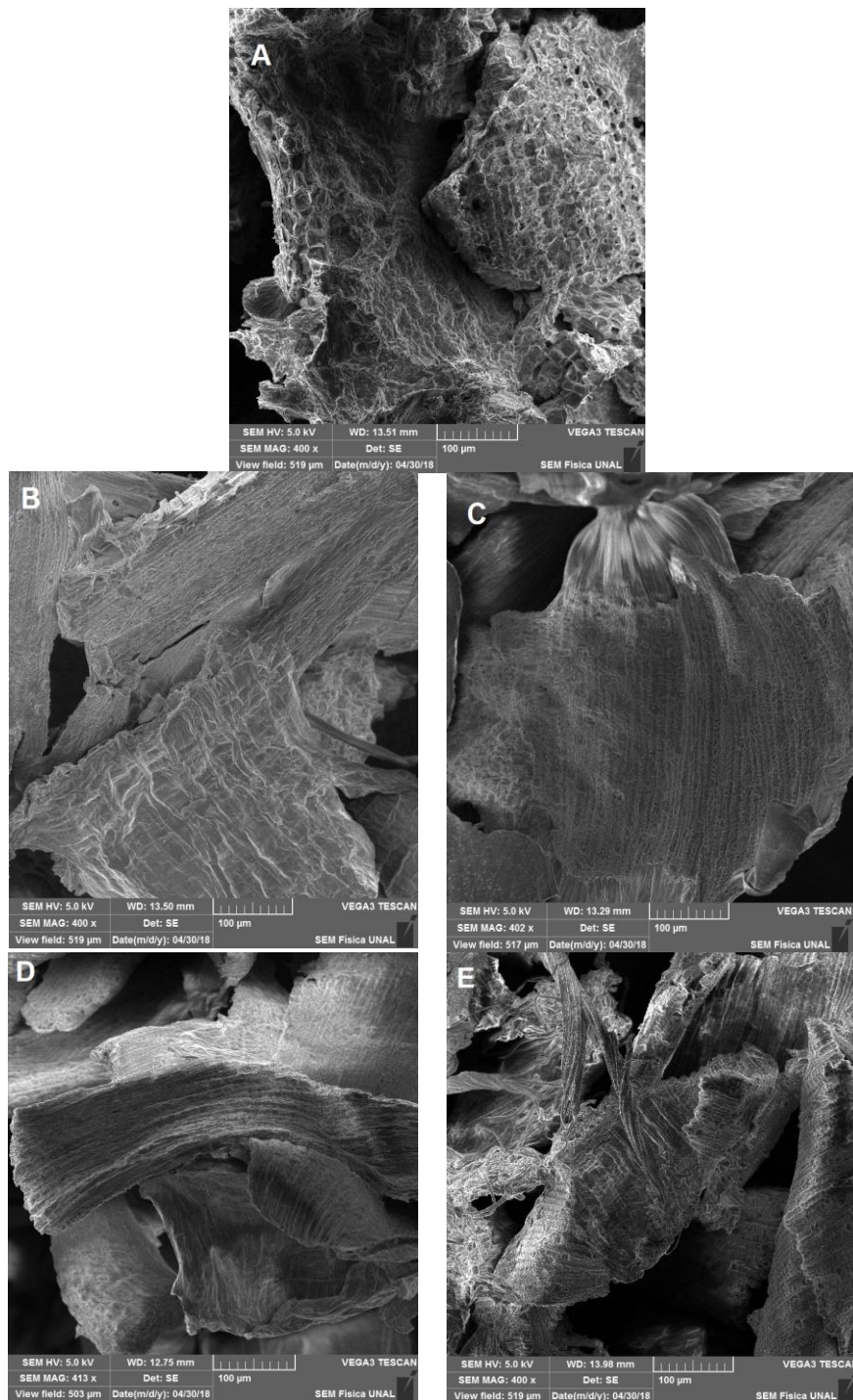


Figura 3-19. Micrografías por SEM, de la cascarilla de cebada sin pre-tratamiento (A) y pre-tratada a tiempo final para los ensayos: severo nivel bajo (B), severo nivel alto (C), moderado nivel bajo (D) y moderado nivel alto (E) a 100 µm

3.3.9 Precipitación alcohólica de AX

Los resultados cualitativos de la separación de los AX extraídos en el líquido correspondiente al ensayo moderado-nivel alto a 12 horas de reacción, se observan en la Figura 3-20 y 3-21. Para el etanol la mejor proporción correspondió a 1:6, mientras que para el metanol se obtuvo una mejor precipitación con una proporción 1:4.

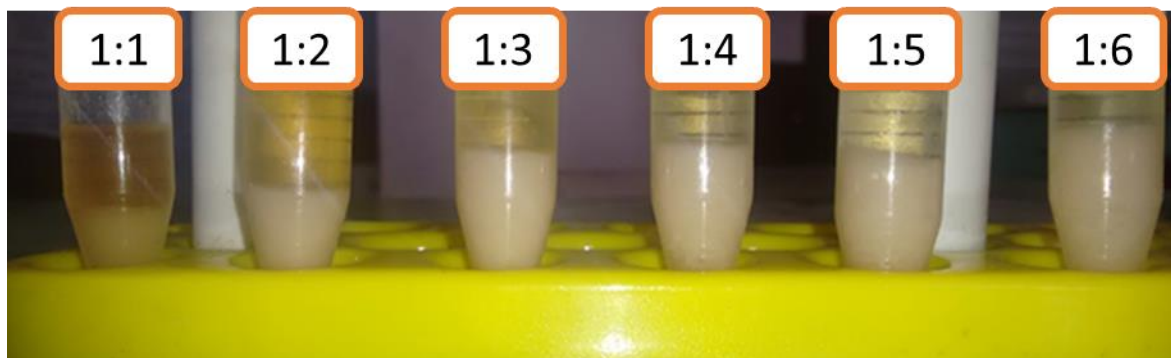


Figura 3-20. Precipitación de AX con etanol a diferentes proporciones

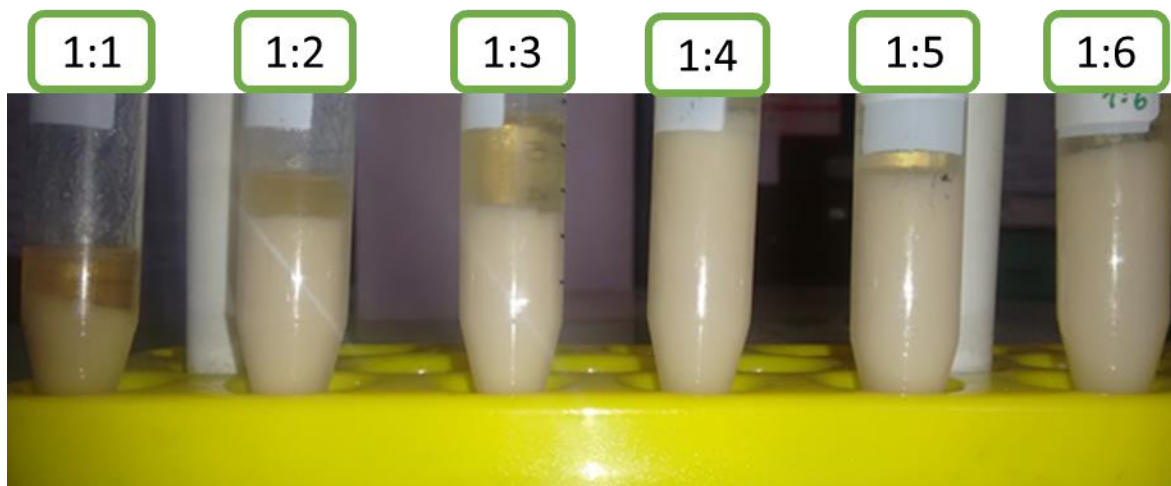


Figura 3-21. Precipitación de AX con metanol a diferentes proporciones

3.3.10 Caracterización de la fracción de AX extraídos

La Tabla 3-11 presenta la caracterización de la fracción de AX extraídos y separados con etanol a una proporción 1:6, a partir del líquido obtenido en el ensayo moderado nivel alto a las 12 horas de extracción. Los azúcares principales que componen la fracción fueron

en porcentaje molar: xilosa ($51\pm3,01\%$), seguido de arabinosa ($26\pm1,67\%$), ácidos urónicos ($14,5\pm5,61\%$) glucosa y galactosa con $4,6\pm0,62$ y $3,1\pm0,24\%$ respectivamente. La ramnosa, fucosa y manosa estuvieron en concentraciones traza.

De la fracción de AX extraídos se lograron cuantificar principalmente los carbohidratos, aportándose particularmente en este trabajo la cuantificación de los ácidos urónicos y confirmándose las sospechas de la presencia de esta sustitución en los AX extraídos también alcalinamente a partir de cascarilla de cebada y caracterizados recientemente por Coelho, Rocha, Moreira, Domingues, & Coimbra, (2016). El porcentaje restante que se desconoce de la fracción corresponde, seguramente, a grupos acetilo, ácido p-cumárico y/o ferúlico que pueden estar aún esterificados con la arabinosa en las ramificaciones de la cadena principal. Inclusive puede haber trazas de proteínas o compuestos nitrogenados que no sean solubles en el medio alcohólico. El 8-O-4' diferulato se ha caracterizado como el dímero dominante que permanece aún esterificado con los AX extraídos a partir de la cascarilla de cebada (Mandalari et al., 2005).

La relación de Ara/Xil fue de 0,5, valor que estuvo de acuerdo con la caracterización realizada por (Vieira et al., 2014; Coelho et al., 2014; Coelho et al., 2016). Esta relación tiende a disminuir con el incremento de la concentración de NaOH en los tratamientos, ya que la alta concentración de álcali es capaz de romper los enlaces de hidrógeno entre las cadenas de AX, permitiendo que se extraigan AX menos ramificados (Mandalari et al., 2005; Coelho et al., 2016).

Tabla 3-11. Composición de los carbohidratos de la fracción de AX extraídos a partir de la cascarilla de cebada sometida al ensayo grado moderado-nivel alto con NaOH

Fracción carbohidratos	Unidad	Valor
Ramnosa	Porcentaje mol (%)	$0,1\pm0,04$
Fucosa		$0,04\pm0,01$
Arabinosa		$26\pm1,67$
Xilosa		$51\pm3,01$
Manosa		$0,3\pm0,03$
Galactosa		$3,1\pm0,24$
Glucosa		$4,6\pm0,62$
Ácidos urónicos		$14,5\pm5,61$
Carbohidratos totales	(g/kg)	$887,6\pm63,46$
Relación Ara/Xil	-	0,5

3.3.11 Caracterización de enlaces glucosídicos de los AX extraídos

Las características estructurales de los AX extraídos para el ensayo moderado-nivel alto en lo referente a la composición de los enlaces glucosídicos, se presentan en la Tabla 3-12.

El principal enlace que se observó en esta fracción fue el (1 → 4)-Xylp, confirmando la presencia de fracciones ricas en AX en este extracto. La cadena principal de xilosa y los xilo-oligosacáridos de menor tamaño extraídos con este pre-tratamiento presentaron mono-sustituciones principalmente en las posiciones 2 (16,1%) y/o 3 (3,4%) y di-sustituciones en las posiciones 2 y 3 (6,1%). La arabinosa se encontró principalmente como un enlace terminal (50,9% en relación con la arabinosa total), lo que estuvo de acuerdo con resultados ya publicados sobre los enlaces glucosídicos de AX de la cascarilla de cebada (Coelho et al., 2014; Reis, Coelho, Coimbra, & Abu-Ghannam, 2015a; Coelho et al., 2016).

El grado de ramificación (DB por sus iniciales en inglés) mostró que los AX extraídos en el ensayo moderado nivel alto presentaron un nivel de ramificación bajo, como es la tendencia con el incremento de la concentración del NaOH usada. Por ejemplo, Coelho et al., (2016) reportaron AX DB de 0,57, 0,45 y 0,28 para pre-tratamientos sobre la cascarilla de cebada con concentraciones de KOH de 0,1 M, 0,5 M y 1 M, respectivamente. Los AX presentes en el líquido de pre-tratamiento estuvieron compuestos de un esqueleto de ~15 unidades de xilosa. La longitud de las cadenas caracterizadas también disminuyen, respecto al incremento de la fuerza del catalizador usado para la extracción (Coelho et al., 2016). Las características asociadas a un bajo grado de ramificación y polimerización en la fracción de AX extraídos a partir de la cascarilla de cebada con álcalis, puede conferirle una baja solubilidad a esta fracción, lo que presentaría problemas asociadas a la siguiente etapa de hidrólisis enzimática.

Tabla 3-12. Composición de los enlaces glucosídicos (% mol) de la fracción de AX extraídos, separados y purificados del pre-tratamiento grado moderado-nivel alto con NaOH sobre la cascarilla de cebada

Enlace glucosídico	% mol
T-Araf	8,1
2-Araf	3,2
3-Araf	3,1
5-Araf	1,2
3,5-Araf	0,3
Total	15,9
T-Xylp	4,7
4-Xylp	42,3
2,4-Xylp	16,1
3,4-Xylp	3,4
2,3,4-Xlp	6,1
Total	72,6
T-Galp	1,3
3-Galp	0,4
4-Galp	0,5
6-Galp	0,2
2,3,4-Galp	1,8
Total	4,2
T-Glcp	0,4
4-Glcp	4,2
4,6-Glcp	2,0
Glucitol	0,7
Total	7,3
AX DB	0,4
AX DP (%)	15,4
T-Ara/Xyl _{subst}	0,27

T: Terminal

3.3.12 Hidrólisis enzimática

▪ Ensayo de efecto sinérgico entre las enzimas

En las Figuras 3-22 y 3-23 se presenta la curva de progreso para la liberación de xilosa a través del tiempo, en primera medida para los primeros 90 minutos y posteriormente hasta las 48 h de reacción, para los ensayos I al V, descritos en la Tabla 3-3. Las figuras muestran la liberación de xilosa a través del tiempo para los primeros cinco ensayos, en donde se

puede comparar en el ensayo I, la adición de todas las enzimas con los ensayos en los cuales se prescindió de una de las actividades enzimáticas específicas endo-1,4- β -xilanasas o α -L-arabinofuranosidasas (ensayos II-V). La zona lineal de la curva se pierde rápidamente, a los 10 minutos de reacción, como se observa en la Figura 3-22, resultado que está de acuerdo con lo que han descrito Rasmussen et al., (2012) y McCleary et al., (2015) para este tipo de enzimas, sobre AX pero de trigo.

En la Figura 3-23 se observa una zona de equilibrio desde las 18 horas hasta las 48 horas para todos los ensayos a excepción del IV ensayo, donde después de las 24 horas se ve un incremento en la liberación de producto. La mayor liberación de xilosa en concentración se obtuvo en orden decreciente para el ensayo IV (0,36 g/L), ensayo I (0,27 g/L), ensayo II (0,24 g/L), ensayo III (0,22 g/L) y ensayo V (0,18g/L).

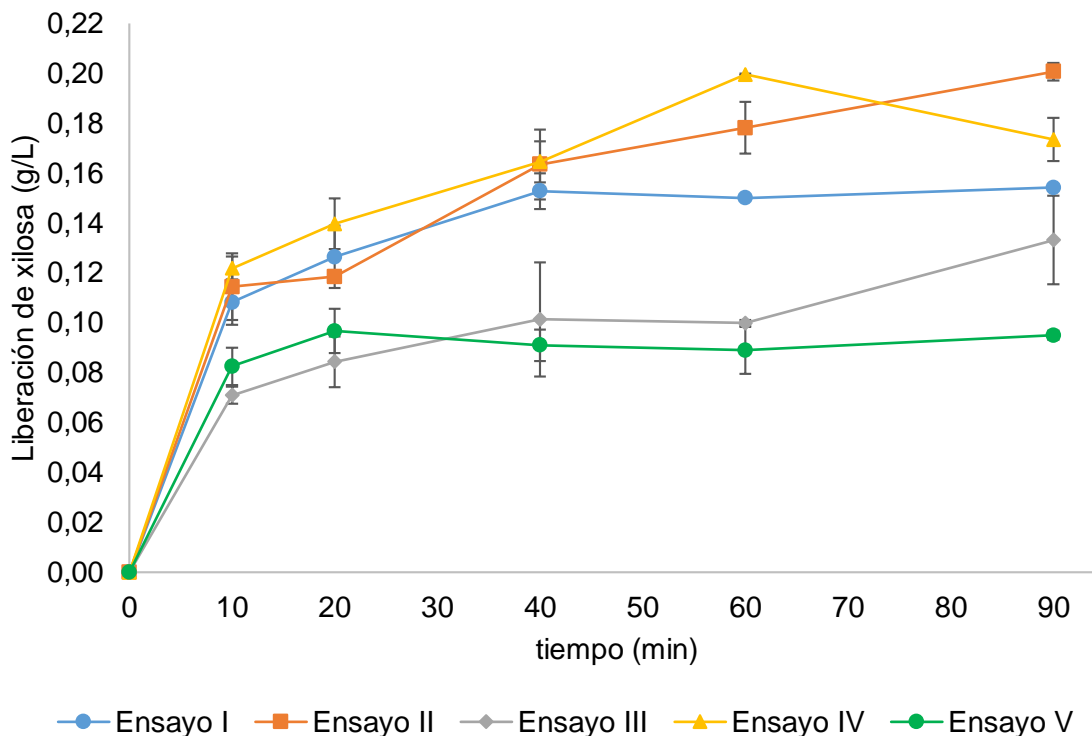


Figura 3-22. Curva de progreso para la liberación de xilosa, ensayos I al V a 90 minutos de reacción. **Ensayo I** (todas las enzimas), **Ensayo II** (todas las enzimas menos endo-1,4- β -xilanasas GH11), **Ensayo III**: (todas las enzimas menos endo-1,4- β -xilanasas GH10), **Ensayo IV** (todas las enzimas menos α -L-arabinofuranosidasas GH43), **Ensayo V** (todas las enzimas menos α -L-arabinofuranosidasas GH51)

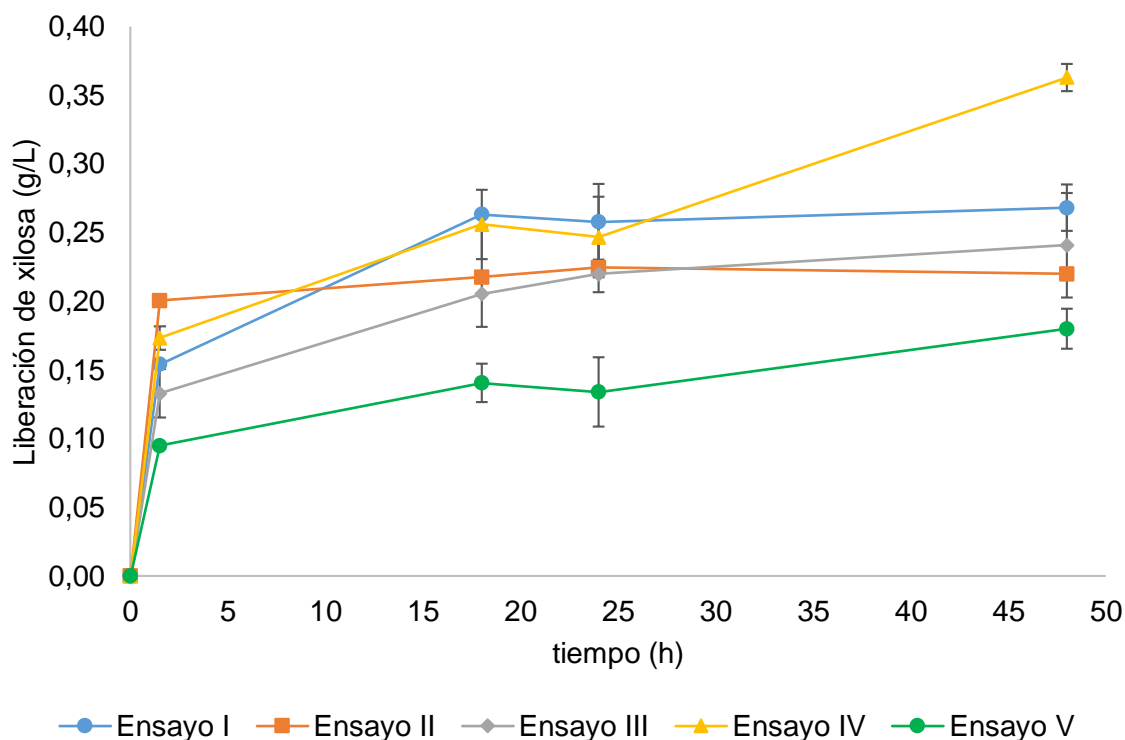


Figura 3-23. Curva de progreso para la liberación de xilosa, ensayos I al V a 48 horas de reacción. **Ensayo I** (todas las enzimas), **Ensayo II** (todas las enzimas menos endo-1,4- β -xilanasa GH11), **Ensayo III**: (todas las enzimas menos endo-1,4- β -xilanasa GH10), **Ensayo IV** (todas las enzimas menos α -L-arabinofuranosidasa GH43), **Ensayo V** (todas las enzimas menos α -L-arabinofuranosidasa GH51)

En la Figura 3-24 se presenta la curva de progreso para la liberación de xilosa a través del tiempo para los primeros 90 minutos de reacción y hasta las 48 horas, para los ensayos VI al IX. Las curvas obtenidas para estos ensayos corresponden al ensayo I en comparación con los ensayos VI-IX en los cuales se prescindió de al menos dos actividades enzimáticas específicas al mismo tiempo (eliminación de una endo-1,4- β -xilanasa y una α -L-arabinofuranosidasa). Los resultados muestran que la mejor combinación de enzimas correspondió al ensayo I (0,27 g/L de xilosa liberada a las 48 horas), seguido del ensayo VI (0,19 g/L), semejante al ensayo VII (0,19 g/L), posteriormente le siguieron en orden decreciente los ensayos VIII y IX con 0,15 y 0,14 g/L de xilosa respectivamente.

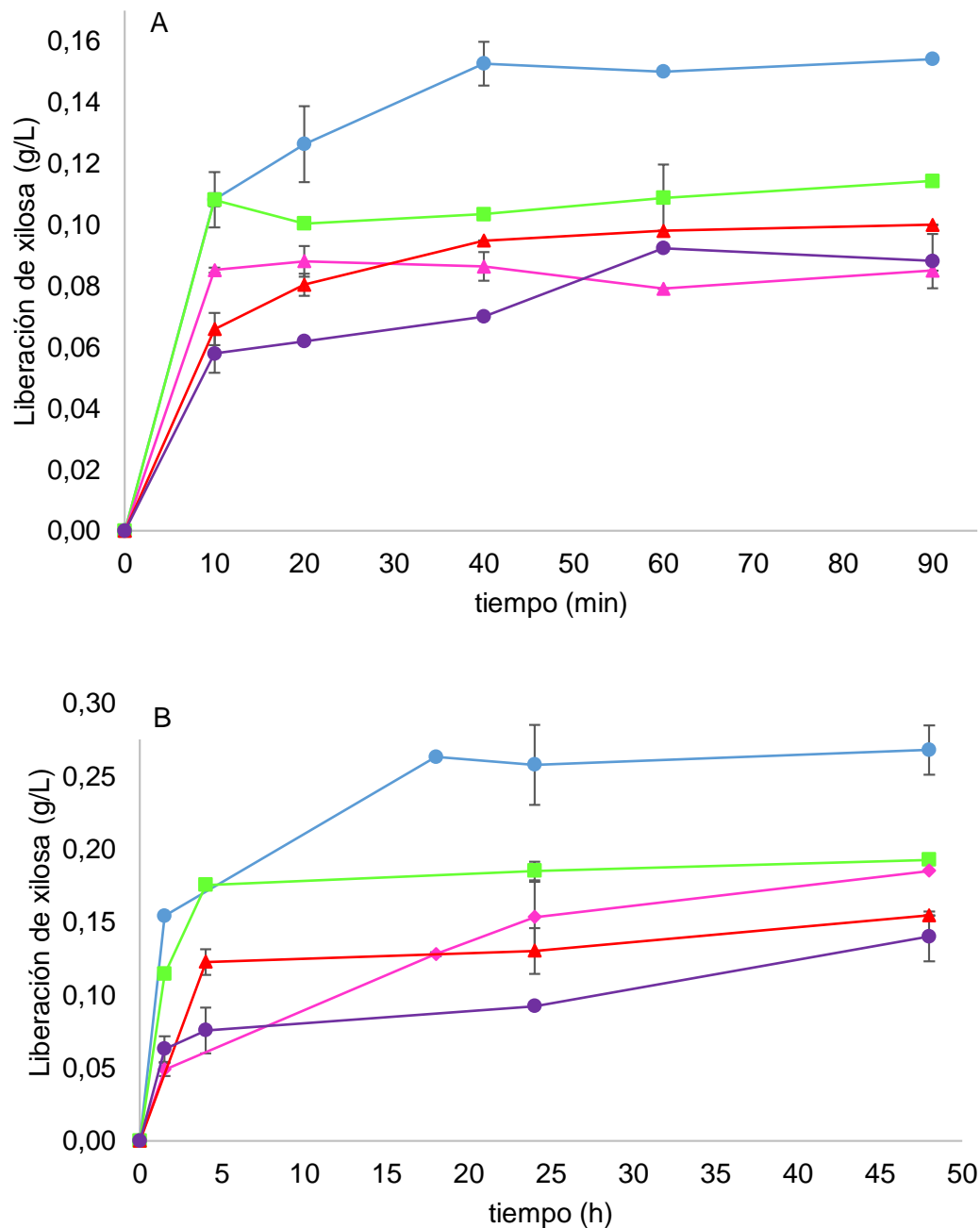


Figura 3-24. Curva de progreso para la liberación de xilosa, ensayos I, VI al IX a 90 minutos de reacción (A) y 48 horas de reacción (B). **Ensayo I** (todas las enzimas), **Ensayo VI** (todas las enzimas menos endo-1,4- β -xilanas GH11 y α -L-arabinofuranosidasa GH43), **Ensayo VII**: todas las enzimas menos endo-1,4- β -xilanas GH11 y α -L-arabinofuranosidasa GH51), **Ensayo VIII** (todas las enzimas menos endo-1,4- β -xilanas GH10 y α -L-arabinofuranosidasa GH43), **Ensayo IX** (todas las enzimas menos endo-1,4- β -xilanas GH10 y α -L-arabinofuranosidasa GH51).

El rendimiento de hidrólisis de xilosa, se definió como se muestra en la Ecuación 3-10.

$$\begin{aligned} \text{Rendimiento de xilosa (\%)} \\ = \left(\frac{\text{Masa xilosa liberada después del proceso de HE}}{\text{Masa de xilosa potencial inicial en la fracción de AX}} \right) \times 100\% \end{aligned} \quad (3-10)$$

El rendimiento de xilosa se muestra en las Figura 3-25 (resumen de los ensayos I al V) y Figura 3-26 (resumen de los ensayos VI al IX, comparados con el ensayo I). El mayor rendimiento que se obtuvo a las 48 horas de reacción, correspondió al ensayo IV (todas las enzimas menos α -L-arabinofuranosidasa de la familia GH43) con un 63,63%, seguido muy cerca del primer ensayo (adición de todas las enzimas) con un 52,9%. Para los ensayos en los cuales se prescindieron de dos actividades enzimáticas específicas (VI-IX) se observó que el rendimiento de reacción disminuyó a las 48 horas hasta valores $\leq 40\%$ en orden decreciente: ensayo VI \geq ensayo VII $>$ ensayo VIII $>$ ensayo IX.

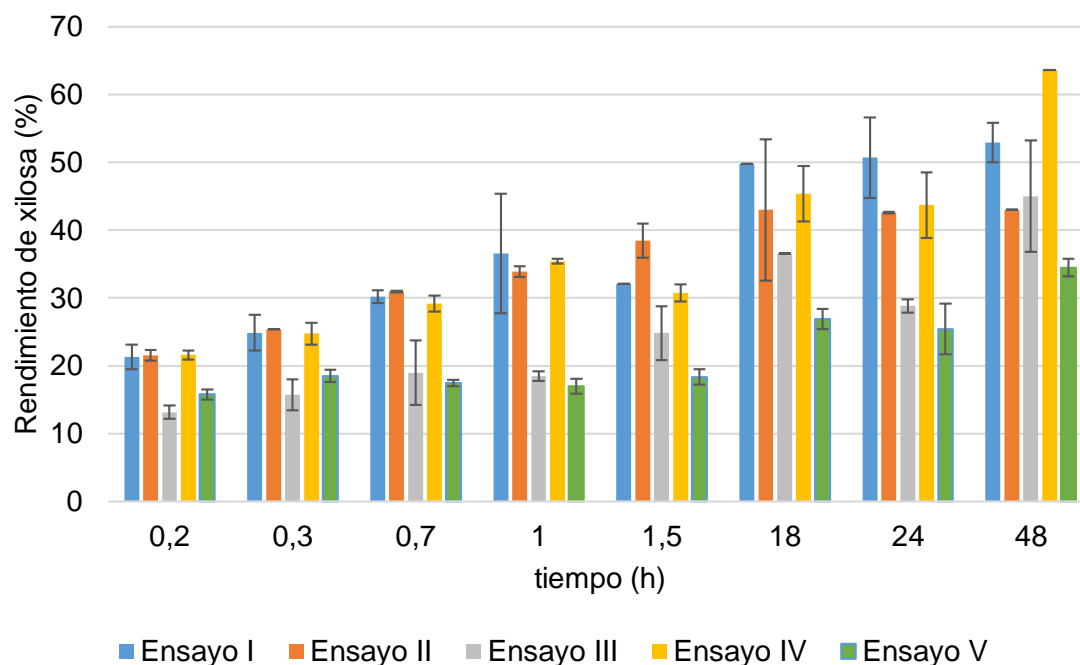


Figura 3-25. Rendimiento de xilosa en la hidrólisis enzimática a través del tiempo, sin la adición de una enzima. **Ensayo I** (todas las enzimas), **Ensayo II** (todas las enzimas menos endo-1,4- β -xilanasas GH11), **Ensayo III**: (todas las enzimas menos endo-1,4- β -xilanasas GH10), **Ensayo IV** (todas las enzimas menos α -L-arabinofuranosidasa GH43), **Ensayo V** (todas las enzimas menos α -L-arabinofuranosidasa GH51)

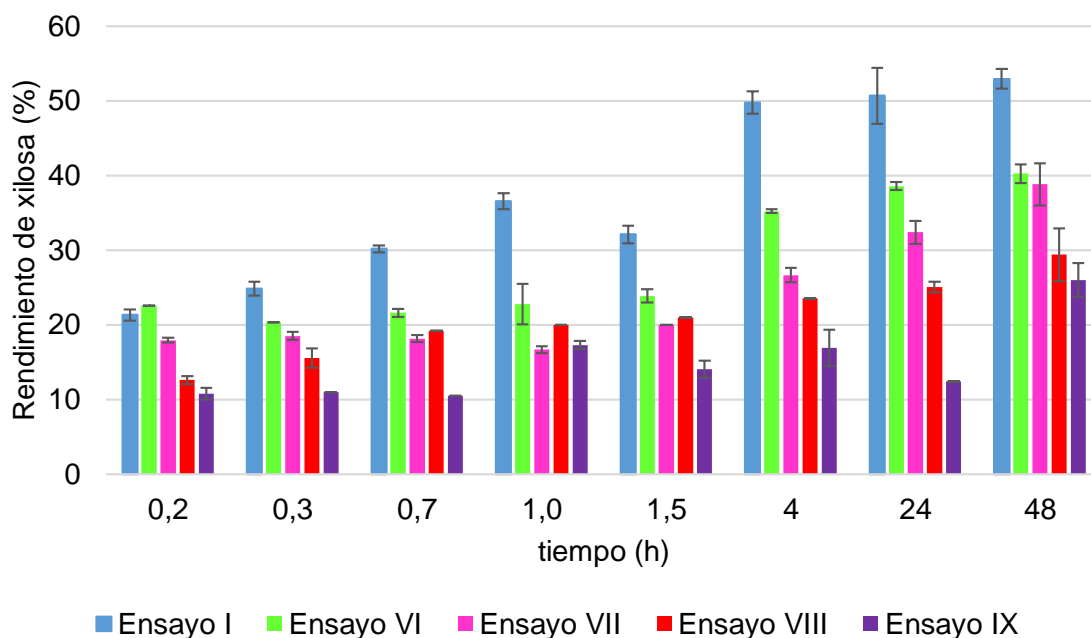


Figura 3-26. Rendimiento de xilosa en la hidrólisis enzimática a través del tiempo, sin la adición de dos enzimas. **Ensayo I** (todas las enzimas), **Ensayo VI** (todas las enzimas menos endo-1,4- β -xilanasas GH11 y α -L-arabinofuranosidasas GH43), **Ensayo VII**: (todas las enzimas menos endo-1,4- β -xilanasas GH11 y α -L-arabinofuranosidasas GH51), **Ensayo VIII** (todas las enzimas menos endo-1,4- β -xilanasas GH10 y α -L-arabinofuranosidasas GH43), **Ensayo IX** (todas las enzimas menos endo-1,4- β -xilanasas GH10 y α -L-arabinofuranosidasas GH51).

De manera general se observa que para los ensayos I al V el rendimiento de reacción comienza a hacerse constante a las 18 horas de reacción, mientras que para los ensayos VI al IX el rendimiento aumenta paulatinamente con el tiempo, sin observarse una zona clara de equilibrio.

Analizando la diferencia entre medias por el test de Tukey para las últimas tres horas de reacción, se observa que para el Ensayo I y II no hay diferencias significativas entre las 18, 24 y 48 horas de reacción. Para el Ensayo III, sí hay diferencias significativas en los tres tiempos, aunque no se ve una tendencia clara de aumento del rendimiento, para el ensayo IV a las 18 y 24 horas las diferencias entre grupos son iguales, pero a las 48 horas se ve un aumento significativo del rendimiento de la reacción. Para el ensayo V a las 18 y 24 horas tampoco hay diferencias entre los rendimientos, pero este aumenta a las 48 horas, aunque no tan significativamente como ocurre para el ensayo IV.

La eliminación de una actividad enzimática relacionada con las endo-1,4- β -xilanasas y α -L-arabinofuranosidasas tuvo un efecto en el rendimiento total de xilosa a través del tiempo, lo que demuestra que estas enzimas actúan en sinergia dependiendo de con quién están mezcladas y en qué porcentaje de combinación. A su vez los tipos de enlaces glucosídicos que están presentes en el sustrato, así como el grado de ramificación y polimerización determinan no solamente el tipo de actividades enzimáticas específicas que deben estar presentes, sino también la posible interacción de las enzimas con el sustrato, ya que la solubilidad de los AX en el medio de reacción, sus propiedades de gelificación y sus posibles impedimentos estéricos, determinan los mecanismos de transferencia de masa y por ende la interacción entre el sustrato y las enzimas.

La comparación entre los rendimientos obtenidos para los ensayos I al V, permite establecer si la eliminación de una de las enzimas tipo endo-1,4- β -xilanasas (GH10 o GH11) o α -L-arabinofuranosidasas (GH43 y GH51) mejora la sinergia con las enzimas restantes.

Los resultados obtenidos muestran que la eliminación de una de las endo-1,4- β -xilanasas, sea de la familia GH10 o GH11, repercute directamente en la liberación de xilosa al menos después de las 18 horas de reacción. Si se comparan los resultados hasta los primeros 90 minutos de reacción para los Ensayos II y III, y el Ensayo I, la eliminación de la endo-1,4- β -xilasa de la familia GH11 no mostró diferencias significativas con el Ensayo I a los 60 minutos, pero la eliminación de la familia GH10 si disminuyó el rendimiento, media hora después (90 minutos de reacción). El Ensayo II presentó diferencias significativas con el ensayo I y III, y mostró un rendimiento mayor. Sin embargo, a medida que transcurrió el tiempo el ensayo I tomó una ligera ventaja sobre el ensayo II y III, viéndose más marcada la diferencia a las 24 horas y reduciéndose a las 48, donde el rendimiento alcanzado para el ensayo I y III no presentó diferencias estadísticamente significativas, así como entre el ensayo II y III.

Por lo tanto, a pesar de que podría eliminarse una de las actividades endo-1,4- β -xilanasas, si la reacción se dejara 24 o incluso 48 horas se obtendría un mayor rendimiento con la adición de las dos familias de la actividad endo-1,4- β -xilanasas. Lo anterior, a pesar de que (Biely et al., 2016) aseveran que como regla general las xilanasas de la familia GH10

generan usualmente más xilosa que las enzimas GH11, tendencia que se conservó en estos resultados pero cuya diferencia con la presencia de las dos familias para esta enzima en la mezcla enzimática no afectó mayormente el rendimiento final.

En cuanto a la α -L-arabinofuranosidasa, se demostró que la eliminación de la enzima correspondiente a la familia GH51 afecta en mayor medida el rendimiento de xilosa (Ensayo V) que la eliminación de la enzima perteneciente a la familia GH43 (Ensayo IV), resultado que concuerda con los ensayos realizados por Rasmussen et al., (2012) sobre AX solubles de trigo. Entre el ensayo IV y V siempre hubo diferencias significativas en función del tiempo, el rendimiento fue mayor para el ensayo IV, lo cual demostró que puede prescindirse de la adición de la α -L-arabinofuranosidasa de la familia GH43, más no de la actividad enzimática relacionada con la familia GH51. La α -L-arabinofuranosidasa de la familia GH43 presenta una alta especificidad por el enlace disustituido 2,3 en la cadena principal de los xilo-oligosacáridos, por tanto, hidrolizar tan solo el 6,1% en mol de este enlace no afecta significativamente la liberación de xilosa en el medio de reacción, para los AX extraídos en el ensayo moderado nivel alto a partir de cascarilla de cebada.

Entre la eliminación de esta enzima y el ensayo I, que contempló la mezcla de todas las enzimas a las 24 horas de reacción, no se observan diferencias significativas. Incluso a las 24 horas de reacción se obtiene el mismo rendimiento para el ensayo I y IV. Sin embargo, a las 48 horas, se observa una diferencia mayor entre el ensayo I y IV, obteniéndose un mayor rendimiento de liberación de xilosa para el ensayo IV que contempló la mezcla de todas las enzimas menos la α -L-arabinofuranosidasa de la familia GH43.

La Figura 3-26 presenta el resumen de los rendimientos obtenidos para la liberación de xilosa en los ensayos VI a IX, en donde se prescindió de dos actividades enzimáticas, variando la eliminación de una endo-1,4- β -xilanasas al tiempo con una α -L-arabinofuranosidasa. Los cuatro ensayos se comparan a su vez con el ensayo I (adición de todas las enzimas).

Ninguno de los cuatro ensayos realizados con la eliminación de dos enzimas, logró un rendimiento como el alcanzado en el ensayo I, lo que demostró que la eliminación simultánea de dos actividades enzimáticas endo-1,4- β -xilanasas y α -L-

arabinofuranosidasa, independientemente de su familia, afecta negativamente la liberación de xilosa.

Si se compara el ensayo VI con el ensayo VII, en los que se prescindió de la actividad endo-1,4- β -xilanasa GH11, se observa que el rendimiento fue mayor para el ensayo en el cual estaba presente la enzima α -L-arabinofuranosidasa de la familia GH51, lo cual corrobora la mayor sinergia que tiene esta enzima con la endo-1,4- β -xilanasa de la familia GH10. El efecto se observó de una manera más marcada hasta las 24 horas, a las 48 horas no se encontraron diferencias significativas en estos dos ensayos.

El rendimiento obtenido para los ensayos VIII y IX, en los que se prescindió de la endo-1,4- β -xilanasa de la familia GH10, se observa un menor rendimiento comparado con los ensayos en la cual esta enzima estaba presente (Ensayo VI y VII). De nuevo la presencia de la enzima α -L-arabinofuranosidasa de la familia GH51 tiene una mayor sinergia para liberar más xilosa (Ensayo VIII) en comparación con el ensayo IX donde esta enzima no se agregó, de nuevo esta diferencia fue más significativa para las 24 horas y a las 48 horas los rendimientos se igualan entre estos dos ensayos.

En conclusión, los rendimientos máximos de xilosa alcanzados con la mezcla de enzimas propuestas en esta investigación fueron del 53% para el I ensayo (mezcla de todas las enzimas) y 63% para el IV ensayo (mezcla de todas las enzimas menos la α -L-arabinofuranosidasa GH43). Fue menor al 40% para la mezcla enzimática en la cual se prescindió de dos actividades endo-1,4- β -xilanasa y α -L-arabinofuranosidasa simultáneamente. Estos resultados demostraron la sinergia entre las cuatro actividades enzimáticas principales evaluadas: endo-1,4- β -xilanasas, β -xilosidasas, α -L-arabinofuranosidasas y α -glucuronidasas, aunque es posible prescindir en cierta medida de la actividad específica endo-1,4- β -xilanasa de la familia GH11 y α -L-arabinofuranosidasa de la familia GH43, más no de alguna de las dos actividades específicas endo-1,4- β -xilanasas y α -L-arabinofuranosidasas al tiempo.

Rasmussen et al., (2012) concluyen en su estudio de hidrólisis enzimática sobre AX solubles de trigo, que la actividad enzimática xilanasa es la actividad dominante que puede limitar la velocidad de reacción para la hidrólisis de xilosa, aunque tiene que actuar

cooperativamente con las α -L-arabinofuranosidasas y β -xilosidasas, como también se reveló en este estudio.

Mccleary et al., (2015) lograron una conversión de aproximadamente el 90% de xilosa y arabinosa de AX de harina de trigo con una mezcla de enzimas que contenía: *N. patriciarum* β -xilanasa (1300 U/ml), *S. ruminantium* β -xilosidasa (200 U/ml), *B. adolescentis* α -L-arabinofuranosidasa (700 U/ml), *U-maydis* α -L-arabinofuranosidasa (75 U/ml) y *A. niger* α -L-arabinofuranosidasa (170 U/ml) en tan solo hora y media de reacción y aluden que no pudieron incrementar la conversión con la adición de otra enzima, lo cual sugirió la presencia de otros grupos sustituyentes en los arabinoxilanos, tales como el ácido ferúlico, el cual pudo prevenir la hidrólisis completa del sustrato. Mandalari et al., (2005) y Coelho et al., (2016) también demostraron en la caracterización de la fracción de AX aislada con el pre-tratamiento con KOH 4 M sobre cascarilla de cebada, la posible presencia de ácido ferúlico unido a la posición O-5 de la arabinosa, lo cual pudo ser un impedimento estérico para la hidrólisis enzimática completa de los ensayos realizados en esta investigación, ya que en la mezcla evaluada no se contó con esta actividad accesorio específica.

La presencia de los ácidos urónicos en la estructura de los AX aislados en el pre-tratamiento moderado-nivel alto de la cascarilla de cebada, evidenció la necesidad de la adición de una enzima específica tipo α -glucuronidasa. En los ensayos la α -glucuronidasa de la familia GH67 se adicionó en un 31% respecto a la mezcla total de enzimas, sin embargo, por varias razones esta enzima pudo no haber actuado al 100% de sus condiciones óptimas. En primera instancia, tanto el pH como la temperatura óptima reportada en la ficha técnica de la enzima, se sacrificaron respecto al pH y al balance de las temperaturas óptimas de las otras enzimas (Tabla 3-2 y Figura 3-3). La α -glucuronidasa de la familia GH67 solamente es capaz de liberar el MeGlcA de los oligosacáridos que tienen el ácido urónico en el extremo no-reductor del residuo de Xylp (Figura 1-15), si el ácido urónico no se encuentra en esta posición sino en los residuos internos del oligosacárido, se requerirá de una α -glucuronidasa adicional de la familia GH115, con la cual tampoco se contó en estos ensayos. Esto podría mejorarse si la β -xilosidasa lograra actuar primero sobre el extremo no-reductor liberando la xilosa y acortando el ácido aldopentaurónico MeGlcA³Xyl₃ al ácido aldotetraurónico MeGlcA³Xyl₃ (Figura 1-15).

Así, según (Biely et al., 2016) la combinación de cualquier xilanasa GH10 y GH11 con una β -xilosidasa y α -glucuronidasas de la familia GH67 o GH115 debería ser, en teoría, suficiente para lograr una hidrólisis completa de sacarificación de los xilanos extraídos alcalinamente de maderas duras. Sin embargo, esto no se logró con los AX extraídos alcalinamente de la cascarilla de cebada en estos ensayos, una de las razones adicionales a las ya expuestas puede estar relacionada con la presencia adicional de la sustitución con galactosa, la cual pudo bloquear la acción de las α -glucuronidasas y podría dejar en evidencia la necesidad de la adición de otra enzima con actividad específica galactosidasa.

Los rendimientos máximos alcanzados en este ensayo concordaron con lo encontrado por Sørensen, Pedersen, Jørgensen, & Meyer, (2007), quienes encontraron un 56% y 66% de liberación de arabinosa y xilosa de arabinoxilanos de trigo solubles empleando una mezcla de α -L-arabinofuranosidasas en combinación con β -xilosidasas y endo-1,4- β -xilanasas. De manera general ellos encontraron que las endo-1,4- β -xilanasas de la familia GH11 son más activas sobre xilanos poliméricos insolubles y las endo-1,4- β -xilanasas de la familia GH10 son más activas sobre sustratos solubles. Sin embargo, cuando se adicionaron en combinación con las α -L-arabinofuranosidasas, aparentemente solo hubo una pequeña diferencia entre las endo-1,4- β -xilanasas GH10 o GH11 usadas, como también se evidenció en los resultados encontrados sobre la cascarilla de cebada.

Según el estudio de Rasmussen et al., (2012), puede considerarse que la β -xilosidasa prefiere atacar oligómeros relativamente cortos en comparación con moléculas de AX más grandes, para lograr una hidrólisis satisfactoria. Rasmussen et al., (2012), también aseveran que lograr el rompimiento del esqueleto de los AX hasta oligosacáridos más pequeños y así exponer más extremos no reductores (no sustituidos) a la β -xilosidasa, es más importante que remover la arabinosa sustituida para lograr liberar más xilosa de los AX (como se expondrá en los resultados de la HE de los AX con el pre-tratamiento de SE en el Capítulo 4, sección 4.3.7).

Finalmente, también podría contemplarse los efectos de solubilidad que presentan los AX extraídos de la cascarilla de cebada sobre los rendimientos obtenidos en la hidrólisis enzimática, por ejemplo, la pre-hidrólisis alcalina tiene la desventaja de no preservar los grupos acetilo en el xilano (Vázquez, Garrote, Alonso, Domínguez, & Parajó, 2005; Nabarlatz, Ebringerová, & Montané, 2007) como se evidencio en la caracterización de los

WIS después del pre-tratamiento, lo cual limita la solubilidad de los xilo-oligosacáridos en el medio de reacción (Nabarlitz et al., 2007; Azevedo, de Oliva, Fernandes, & Pastore, 2013)

▪ **Ensayo variando la concentración de sustrato**

En la Figura 3-27 se presentan las curvas de progreso para la liberación de xilosa a través del tiempo a 24 horas de reacción variando la concentración de sustrato de 1 a 5 g/L. La mayor concentración de xilosa libre se obtuvo para el ensayo a mayor concentración de sustrato, como también fue identificado por Rasmussen et al., (2012) en su estudio sobre AX solubles de trigo. En ese estudio la concentración de sustrato varió de 0,125 a 4 g/L, aunque todas las enzimas se adicionaron en cantidades equimolares y se evaluó la reacción solamente hasta las primeras 4 horas.

Los rendimientos de hidrólisis de xilosa para estos ensayos, variando la concentración de sustrato se evaluaron a dos tiempos: 1,5 horas y 24 horas. Los resultados se presentan en la Figura 3-28, donde se evidencia que a 24 horas se obtienen los mayores rendimientos de xilosa, ligeramente superior el rendimiento encontrado para la concentración de 2g/L con un 66,78% y semejantes entre los resultados obtenidos para los ensayos a 3, 4 y 5 g/L (con porcentajes de 55 a 59%). El menor rendimiento se obtuvo para la concentración de 1 g/L con 50,69%. Cabe destacar que, según el análisis estadístico de diferencia entre medias, a las 1,5 horas no hay diferencias significativas entre la concentración de sustrato de 1 y 2 g/L y entre la concentración de 3 y 4 g/L. Sin embargo, el rendimiento de xilosa sí fue diferente para los dos primeros sustratos en comparación con la concentración de los sustratos intermedios (3 y 4 g/L) y estos ensayos a su vez fueron diferentes de la concentración realizada a 5 g/L.

El comportamiento de la diferencia entre medias cambió sustancialmente a las 24 horas de reacción. Allí el mayor rendimiento se alcanzó para el ensayo realizado con una concentración a 2 g/L, le siguió la concentración a 3 y 5 g/L (estos dos ensayos presentaron la misma diferencia entre medias), posteriormente siguieron los ensayos a 3 y 4 g/L y finalmente el menor rendimiento se obtuvo con 1 g/L. El mayor rendimiento se obtuvo a la concentración de sustrato de 2 g/L, ya que con el incremento de sustrato posiblemente se incremente el grado de insolubilidad de los AX en el medio. Rasmussen et al., (2012) considera que la medición cinética de la β -xilosidasa que cataliza la despolimerización de

los AX solubles de trigo es particularmente difícil dado el equilibrio que debe existir entre obtener suficiente cantidad de xilosa inicial para su cuantificación y emplear altas concentraciones de sustrato dado que a altas concentraciones de sustrato, el sustrato es muy viscoso.

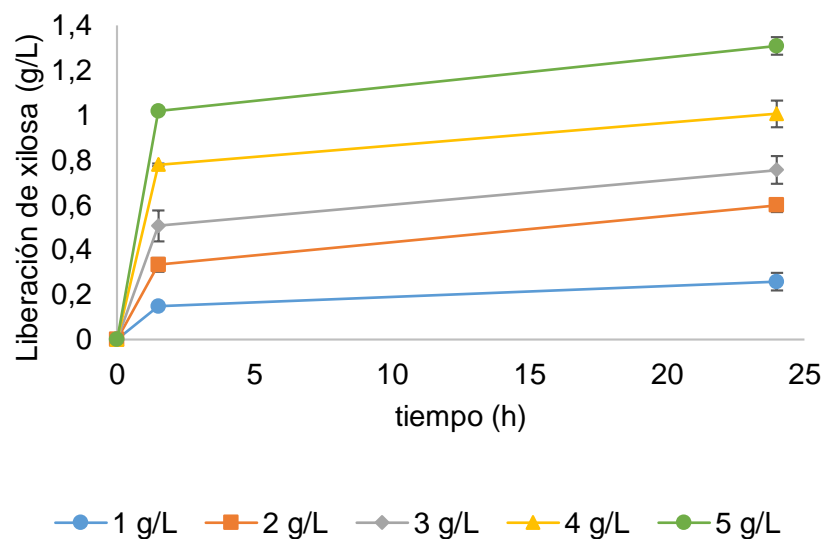


Figura 3-27. Liberación de xilosa a través del tiempo a diferentes concentraciones de sustrato

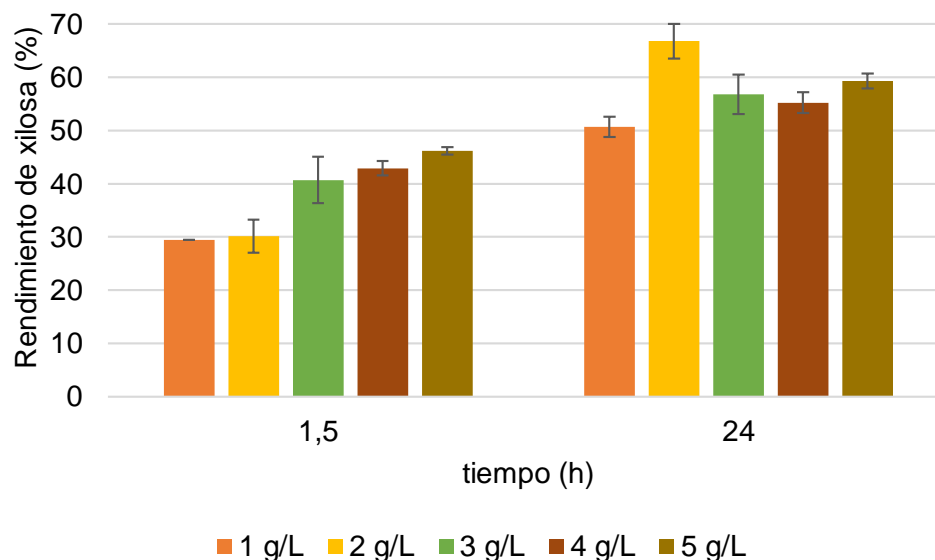


Figura 3-28. Rendimiento de xilosa a través del tiempo a diferentes concentraciones de sustrato

En la Figura 3-29 y 3-30 se representa la curva de progreso para la liberación de arabinosa y el rendimiento de este azúcar para los ensayos variando la concentración de sustrato, respectivamente. La mayor concentración de arabinosa liberada se obtuvo para el ensayo a 5 g/L, aunque el mayor rendimiento se obtuvo para el ensayo a 1 g/L con 40,14% (Figura 3-29), para el resto de concentraciones, el porcentaje de liberación de arabinosa vario de 32 a 38%.

A las primeras 1,5 horas se observan diferencias estadísticamente significativas para el ensayo a 1 g/L en comparación con las otras concentraciones del sustrato. Sin embargo, para el ensayo a 2, 3 y 4 g/l no se observaron diferencias entre medias, así como para el ensayo a 4 y 5 g/L. Para las 24 horas de reacción si se observaron diferencias más marcadas en cuanto a la liberación de arabinosa, se destaca que no hubo diferencias significativas entre todos los ensayos a excepción del ensayo realizado a 3 g/L.

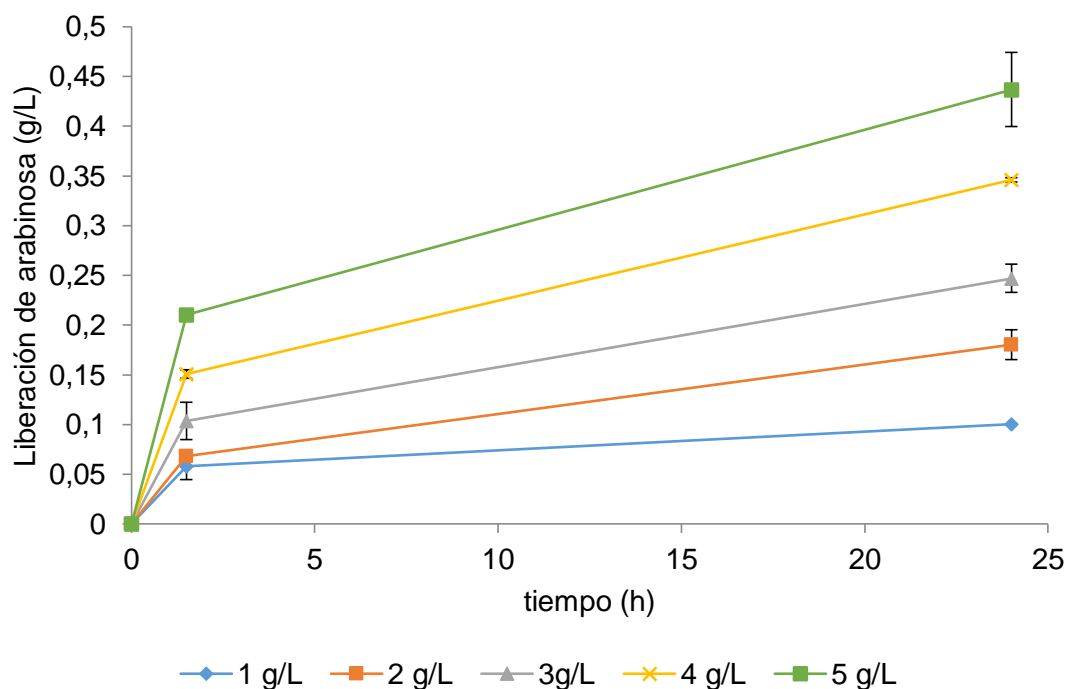


Figura 3-29. Liberación de arabinosa a través del tiempo a diferentes concentraciones de sustrato

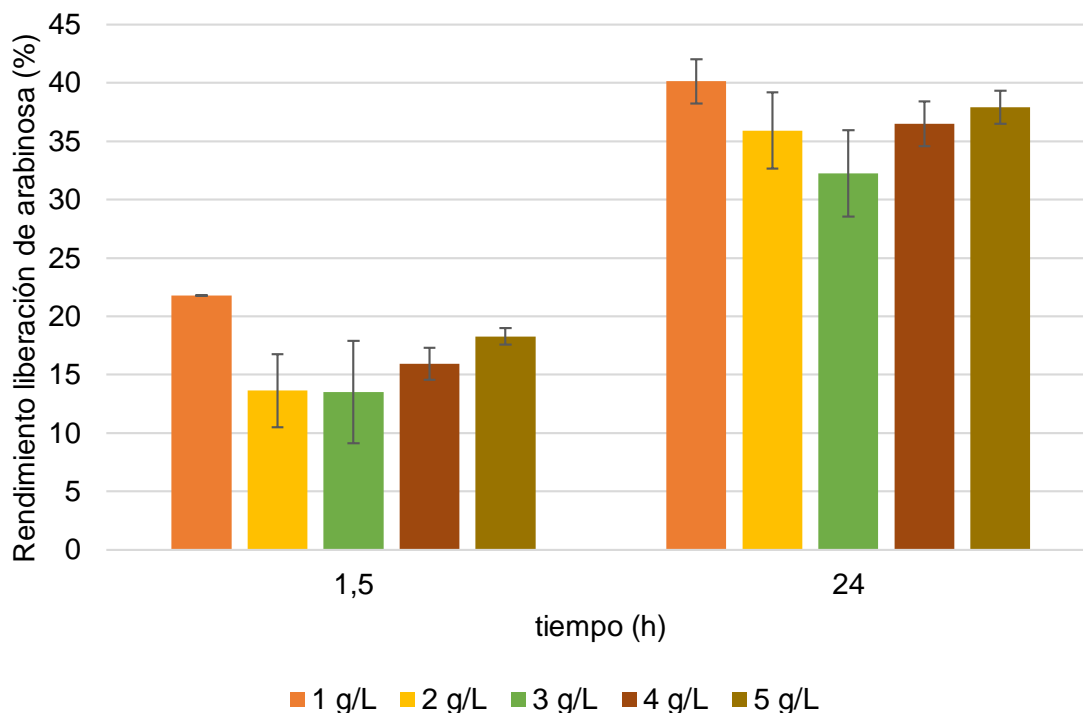


Figura 3-30. Rendimiento de arabinosa a través del tiempo a diferentes concentraciones de sustrato

3.3.13 Fermentación

En la Figura 3-31 se observa el perfil de crecimiento celular, consumo de xilosa y arabinosa y producción de xilitol y arabitól a través del tiempo, para el hidrolizado concentrado después del pre-tratamiento alcalino. En esta figura, se observa el crecimiento casi inmediato de las células una vez estas se inocularon en el reactor. Este comportamiento se explica porque el medio se encontraba libre de compuestos tóxicos que pudieran inhibir o retrasar el crecimiento de la levadura. La xilosa se consumió aproximadamente en un 100% produciendo 58,84 g/L de xilitol en 70 horas de fermentación, la arabinosa empezó a consumirse después de las 30 h horas y alcanzó a producir 5,33 g/L de arabitól. El rendimiento $Y_{P/S}$ fue de 0,73 g xilitol/g xilosa y la Q_P 1,14g de xilosa/L/h.

Estos resultados concuerdan con los de Ping, Ling, Song, & Ge, (2013) quienes reportaron una concentración de xilitol de 38,8 g/L después de 84 horas de fermentación sobre un hidrolizado ácido de tuzas de maíz no-detoxificado, con un rendimiento de 0,7 g/g y una productividad de 0,46 g/L/h. Wang, Ling, & Zhao, (2015) además, lograron una concentración de xilitol de 35,6 g/L en la mitad del tiempo de fermentación (38 horas)

respecto a este estudio, con una productividad de 0,94 g/L/h y un rendimiento de xilosa de 0,71 g/g, aunque ellos usaron la estrategia de incrementar el tamaño del inoculo a 1,6 g/L.

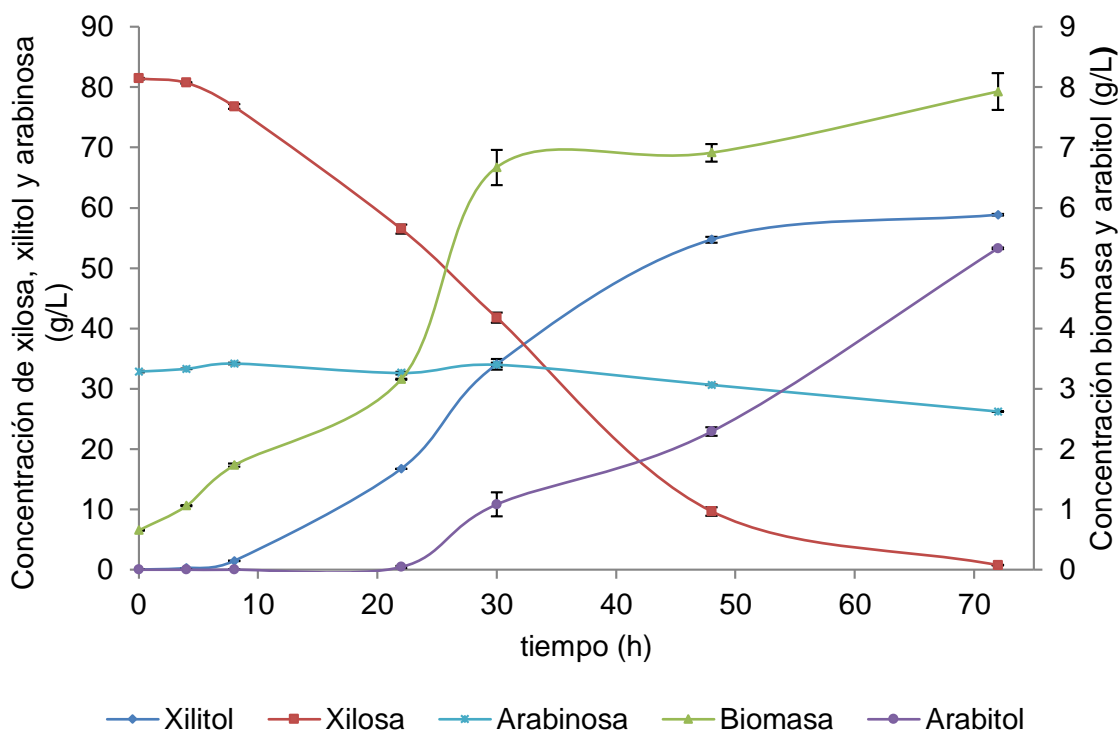


Figura 3-31. Perfiles de crecimiento celular, consumo de xilosa y arabinosa y producción de xilitol y arabitól, ensayo en reactores de 1 L con k_{La} de $15h^{-1}$.

3.4 Conclusiones

Se logró extraer el 64,81% de AX de la cascarilla de cebada con el pre-tratamiento alcalino grado moderado nivel alto en 12 horas de reacción. Le siguieron en orden de extracción el ensayo moderado nivel bajo 53,04% de AX entre 2-8 horas de reacción, para los ensayos del grado severo se obtuvo 44,10 y 41,25% para el nivel bajo y alto, respectivamente.

En el ensayo moderado nivel alto se obtuvo el mayor rendimiento de extracción de la xilosa con un 63,92%, seguido por el ensayo moderado nivel bajo con un 54,02%, en tercer lugar, se encontró el ensayo severo bajo con un 39,55% y en último lugar se ubicó el ensayo severo nivel alto con un 20,06%.

La arabinosa se logró extraer en mayor medida para los ensayos del nivel alto 76,06 y 76,09% para el ensayo severo y moderado, respectivamente. En el nivel bajo se encontraron rendimientos de extracción de 53,07% y 51,11% para el ensayo severo y moderado, respectivamente.

El mayor porcentaje de gluco-oligosacáridos que se lograron extraer fue de 13,83% para el ensayo moderado nivel bajo, del 7,15% y 5,03% para el ensayo severo nivel bajo y moderado nivel alto, respectivamente.

Estadísticamente, el efecto de la interacción de segundo orden: grado*nivel*tiempo fue altamente significativa ($p\text{-valor}<0,05$), ósea que los tres factores evaluados en el pre-tratamiento son dependientes e influyen en el rendimiento de extracción de los azúcares de la hemicelulosa.

El tratamiento alcalino sobre la cascarilla de cebada es efectivo en la remoción de los grupos acetilo de la hemicelulosa extraída en el líquido de pre-tratamiento, la temperatura tuvo la mayor influencia en la extracción de estas ramificaciones.

La cinética pseudo-homogénea de primer orden irreversible del modelo de Saeman se ajustó a los cuatro ensayos de pre-tratamiento alcalino evaluados, pero solo para tres de las temperaturas ensayadas (40, 60 y 90°C) se pudo correlacionar la energía de activación, mediante la ecuación de Arrhenius.

El pre-tratamiento alcalino fue efectivo en lograr la extracción de la proteína contenida en la cascarilla de cebada.

Los principales compuestos fenólicos que se liberan en el pre-tratamiento alcalino son el ácido p-cumárico y ferúlico, en mayor medida para el ensayo severo nivel alto, seguido del ensayo severo nivel bajo y en menor medida para los ensayos a condiciones moderadas. Por tanto, la temperatura tiene el mayor efecto sobre la liberación de estos compuestos.

Los WIS se concentran principalmente en celulosa, quedando desproteinizados y sin presencia de grupos acetilo. Adicionalmente, se demostró estadísticamente mediante el Análisis de Covarianza, que las variables de respuesta en cuanto a la composición del material pre-tratado no tienen ninguna relación directa con la composición inicial del material.

La mejor proporción volumétrica para extraer la mayor cantidad de AX mediante la precipitación alcohólica correspondió a una proporción 1:6 para etanol y 1:4 para metanol.

Los AX separados del líquido de pre-tratamiento alcalino para el ensayo moderado nivel alto a 12 horas de reacción presentaron un porcentaje de 52% en mol de xilosa y 26% de arabinosa, demostrándose adicionalmente la presencia de ácidos urónicos con un 13,1% en mol.

Se caracterizaron los enlaces glucosídicos de la fracción de AX revelándose mono-sustituciones principalmente en las posiciones 2 (16,1%), 3 (3,4%) y di-sustituciones en las posiciones 2 y 3 (6,1%) de la cadena principal de xilosa, la presencia de sustituciones de galactosa y glucosa en menor proporción, con un grado de ramificación de 0,4 y un grado de polimerización de 15,4%.

Se evidenció la sinergia entre las enzimas endo-1,4- β -xilanasas de las familias GH10 y GH11 con las α -L-arabinofuranosidasas principalmente de la familia GH51 y las β -xilosidasas y α -glucuronidasas, en la liberación de xilosa a 48 horas de reacción.

El mayor rendimiento de liberación de xilosa se obtuvo con el ensayo IV todas las enzimas menos α -L-arabinofuranosidasa de la familia GH43 con un 63,63%, seguido muy cerca del primer ensayo (adición de todas las enzimas) con un 52,9%.

La eliminación simultánea de dos enzimas tipo endo-1,4- β -xilanasas y α -L-arabinofuranosidasa incide directamente en la sinergia de la hidrólisis enzimática, al reducirse el rendimiento de producción de xilosa a valores menores a 40%.

El rendimiento máximo de xilosa, variando la concentración de sustrato se obtuvo para el ensayo a 2 g/L con una liberación de 66,78% en 24 horas de reacción y para la arabinosa se obtuvo a 1 g/L con un rendimiento del 40,14%.

La fermentación del hidrolizado con el k_La de $15h^{-1}$ logro la producción de 58,84 g/L de xilitol en 70 horas, con un rendimiento $Y_{P/S}$ de 0,73 g/g y una Q_P 1,14g/L/h.

3.5 Recomendaciones

Realizar también el seguimiento de la extracción de proteínas a través del tiempo.

Caracterizar tanto la cascarilla de cebada como la fracción de AX extraídos en cuanto a su composición de ácido ferúlico y p-cumárico.

Realizar otros ajustes de los parámetros cinéticos para validar si la temperatura de 30°C definitivamente no se ajusta a la ecuación de Arrhenius.

Evaluar otros porcentajes de combinación y dosis de enzimas sobre la hidrólisis enzimática de los AX extraídos.

Realizar más ensayos de fermentación del hidrolizado obtenido variando el k_{La} y la cantidad de inóculo.

4. Capítulo 4. Segunda opción de proceso: pre-tratamiento de explosión con vapor

4.1 Resumen

La segunda opción de proceso estudiada en esta investigación comprendió la evaluación de los factores temperatura, tiempo y concentración de catalizador (H_2SO_4) en el pre-tratamiento de explosión con vapor (SE) sobre la cascarilla de cebada sin procesamiento y sobre la cascarilla de cebada después de una etapa de desproteinización y eliminación de almidón. El diagrama de operaciones simplificado del proceso diseñado se muestra esquemáticamente en la Figura 4-1.

El máximo rendimiento de xilosa que se obtuvo en el líquido obtenido del pre-tratamiento sobre la cascarilla desproteinizada fue de 47,0%, realizando la operación a 173,5°C por 15,5 min (condiciones optimizadas) e impregnando la biomasa con 0,5% p/v H_2SO_4 .

Posteriormente, en la etapa de hidrólisis enzimática (HE) se evaluaron enzimas comerciales puras y cocteles enzimáticos comerciales, variando a su vez el porcentaje de combinación de las actividades enzimáticas, dosis y temperatura, sobre el líquido concentrado y sin concentrar del SE. Se obtuvo un rendimiento máximo de xilosa del 78-86% para una mezcla de siete enzimas comerciales puras, luego de 24 horas de reacción, y ~80% para la enzima comercial CellicTM Ctec I suplementada con β -xilosidasa en 72 h de reacción.

Finalmente, el hidrolizado rico en xilosa se fermentó hasta xilitol en un reactor de un litro, ajustando el parámetro de escalamiento k_{La} (15h^{-1}). El rendimiento de producción de xilitol fue de 0,76 g/g con una productividad de 0,29 g/L/h.

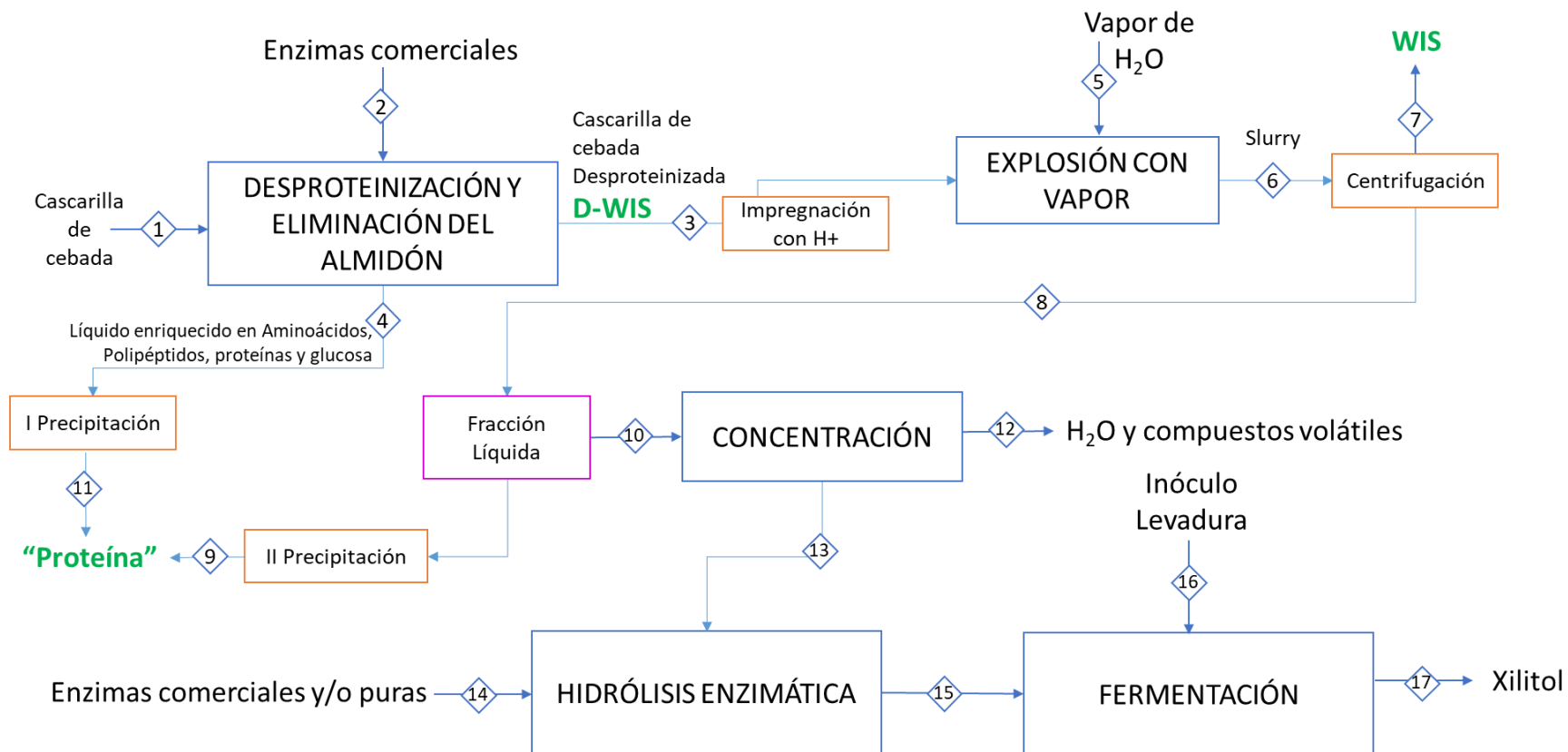


Figura 4-1. Diagrama de operaciones simplificado del proceso de obtención de xilitol a partir de cascarilla de cebada empleando SE.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Adecuación de la cascarilla de cebada

- **Muestreo**

La cascarilla de cebada o cebadilla (coloquialmente llamada así en España) proveniente del proceso cervecero fue suministrada en fresco por la cervecería Mahou, ubicada en Madrid-España.

- **Conservación de la materia prima**

Para los ensayos realizados en el pre-tratamiento por SE, la cascarilla de cebada se almacenó a -4°C en recipientes de plástico herméticamente cerrados, hasta su uso.

4.2.2 Caracterización de la cascarilla de cebada original, desproteínizada y de los sólidos pre-tratados

Muestras representativas de la cascarilla de cebada del lote proporcionado por Mahou, de la cascarilla de cebada desproteínizada y de los sólidos pre-tratados, se secaron y se molieron hasta un tamaño de partícula < 2mm. La caracterización se realizó siguiendo la metodología del CIEMAT con base en los protocolos descritos por NREL, presentados previamente en la sección 3.2.2 (con excepción del análisis elemental SEM).

4.2.3 Desproteínización y eliminación de almidón

- **Estudio del tipo de enzima utilizada para la desproteínización**

Se estudiaron dos tipos de proteasas a nivel laboratorio para definir la etapa de desproteínización previa al SE. El primer tipo de enzima probada fue una pepsina comercial marca Merck® y la segunda una serina endopeptidasa producida por *Bacillus licheniformis*, con un pH óptimo alcalino, comercialmente conocida como Alcalase® 2.5 L de Novozymes.

En primera instancia, los ensayos con la pepsina se realizaron en un biorreactor Terrafors-IS de 15 L (InforsHT, Suiza), denominado RACS (reactor de altas cargas de sólidos), este tiene una capacidad de 3-4 kg de sólidos o semisólidos, o 7 L en caso de líquidos. La cámara contiene placas deflectoras en su interior para mejorar la mezcla y está unida a un motor cuya velocidad de rotación puede variar entre 0,1 y 10 rpm. El RACS, dispone de una

camisa de agua, que permite fijar la temperatura de incubación. Este se cargó con 10% de sólidos en base seca, pH de 3,8 a 37°C y una agitación de 5 rpm por 24 horas de tiempo de residencia. La actividad enzimática que se utilizó en la reacción fue de 2,5 U/g de sustrato (Wood et al., 2016; Teh, Bekhit, Carne, & Birch, 2016; Shavandi et al., 2017). Los sólidos pre-tratados se centrifugaron a 8000 rpm por 15 min en una centrífuga Sorvall RC 6 Plus Thermo Scientific Co (Waltham, MA, USA). El sobrenadante se retiró y una parte del sólido desproteinizado se secó y molió, para luego medir la humedad y así realizar la caracterización del contenido de proteína, por el método de Kjeldahl.

El rendimiento de extracción de proteína se calculó, según la Ecuación 4-1.

Rendimiento de extracción de proteína por acción de las enzimas =

$$\left(\frac{\text{Masa proteína inicial en la cascarilla de cebada} - \text{Masa proteína en los sólidos hidrolizados enzimáticamente}}{\text{Masa proteína inicial en la cascarilla de cebada}} \right) \times 100\% \quad (4-1)$$

Para realizar la HE de las proteínas con la Alcalase® 2.5 L, fue necesario definir las variables más adecuadas de reacción, ya que, según la ficha técnica de la enzima, las condiciones óptimas de temperatura pueden variar entre 30-65°C y el pH entre 7-10. La temperatura se parametrizó para todos los ensayos en 60°C, ya que según reportes de la literatura este valor es adecuado para este tipo de enzima (Sari, Syafitri, Sanders, & Bruins, 2015; Rommi, 2016). Adicionalmente, esta podría ser una temperatura adecuada tanto para las enzimas Spirizyme® como Termamyl® también de la casa comercial Novozymes, catalizadores de la hidrólisis de almidón, proceso que se realizó de manera simultánea con la desproteinización. Lo anterior es necesario porque en el líquido que humecta a la cascarilla de cebada se encontró una elevada concentración de glucosa (20-37%), debida principalmente a la glucosa no estructural y a la glucosa proveniente del almidón, dextrinas y/o β-glucanos, remanentes del proceso de elaboración de la cerveza.

Para definir el pH se evaluaron dos valores: 7,0 y 8,5, estos se ajustaron con *buffer* fosfato de potasio y *buffer* tris (100 mM), respectivamente. Durante la HE se tomaron muestras cada hora durante las cuatro horas de reacción. La corrección de pH se realizó cada hora con la adición manual de una solución de NaOH 4 M. La concentración de sustrato se adecuó al 10% de sólidos en base seca y la dosis de enzima se ajustó al 1,9% p/p (Wang, Li, Li, & Sui, 2011). La actividad enzimática en U/L se determinó como se describe en la sección 4.2.8. Las enzimas Spirizyme® y Termamyl® se adicionaron en una dosificación

de 200 mg de enzima/kg de sustrato (Duvernay, Chinn, & Yencho, 2013; Wood et al., 2016). Adicionalmente, para cada ensayo se hizo un ensayo control, en el cual no se adicionaron enzimas, pero también se realizó el ajuste de pH a través del tiempo.

▪ **Ensayos con variables definidas para Alcalase® 2.5 L en reactor de 40 L**

Parar desproteinizar una cantidad de cascarilla de cebada suficiente para los ocho ensayos definitivos del SE, se realizó la hidrólisis enzimática con Alcalase® 2.5 L simultáneamente con la eliminación de almidón, en un reactor de 40 L con control de pH por 4 horas de reacción. Las condiciones fueron pH 7,0, 60°C, 10% p/p de carga de sólidos y velocidad de agitación de 250 rpm. Los sólidos desproteinizados se separaron del medio líquido por centrifugación a 3000 rpm durante 15-20 min en una centrifuga Comteifa. El sobrenadante se caracterizó determinando su contenido de azúcares neutros simples. El sólido se lavó con agua destilada y se volvió a congelar en bolsas plásticas herméticamente cerradas hasta los ensayos definitivos del SE. Los sólidos desproteinizados se caracterizaron según la metodología descrita en la sección 3.2.2.

4.2.4 Pre-tratamiento de explosión con vapor

El pre-tratamiento se realizó por lotes en una unidad piloto de SE basada en la tecnología Masonite. La unidad consta de un reactor de 2 L, como se muestra en la Figura 4-2, y está ubicada en la Unidad de Biocarburantes del CIEMAT (Madrid-España). El reactor fue cargado con 200 g de cascarilla de cebada (base seca) por cada ensayo. La cascarilla de cebada húmeda se impregnó con una solución de H₂SO₄ 5% p/v, por un periodo de 12 horas.

Una vez cargada la biomasa, se permitió el ingreso directo de vapor saturado, el cual se producía en un generador de vapor a 240°C. El tiempo cero se definió en el momento en el que el reactor alcanzaba la temperatura de ensayo, entre 14-31 segundos después del ingreso del vapor.

Después de alcanzado el tiempo de ensayo de pre-tratamiento, el material se descomprime súbitamente hasta alcanzar la presión atmosférica (13,6 psia), recuperándose en un tanque de expansión a una temperatura ~40°C. Posteriormente, la cascarilla de cebada pre-tratada y húmeda se separó por centrifugación a 3000 rpm durante 15-30 minutos en una centrifuga Comteifa equipada con cestas de diámetros de 140mm hasta 400mm. Los WIS, se lavaron

y centrifugaron simultáneamente con 5 L de agua destilada, para remover la proteína soluble remanente y los azúcares extraídos en el pre-tratamiento que podrían seguir humectando al sólido. Los WIS fueron analizados como se describió en la sección 3.2.2 y se determinó el contenido de azúcares monoméricos libres y totales (previa hidrólisis ácida con H_2SO_4 al 4% v/v, 121°C por 30 min), ácido acético, compuestos fenólicos y productos de degradación como el ácido fórmico, furfural y 5-hidroximetilfurfural (HMF) de la fracción líquida, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 4.2.8.

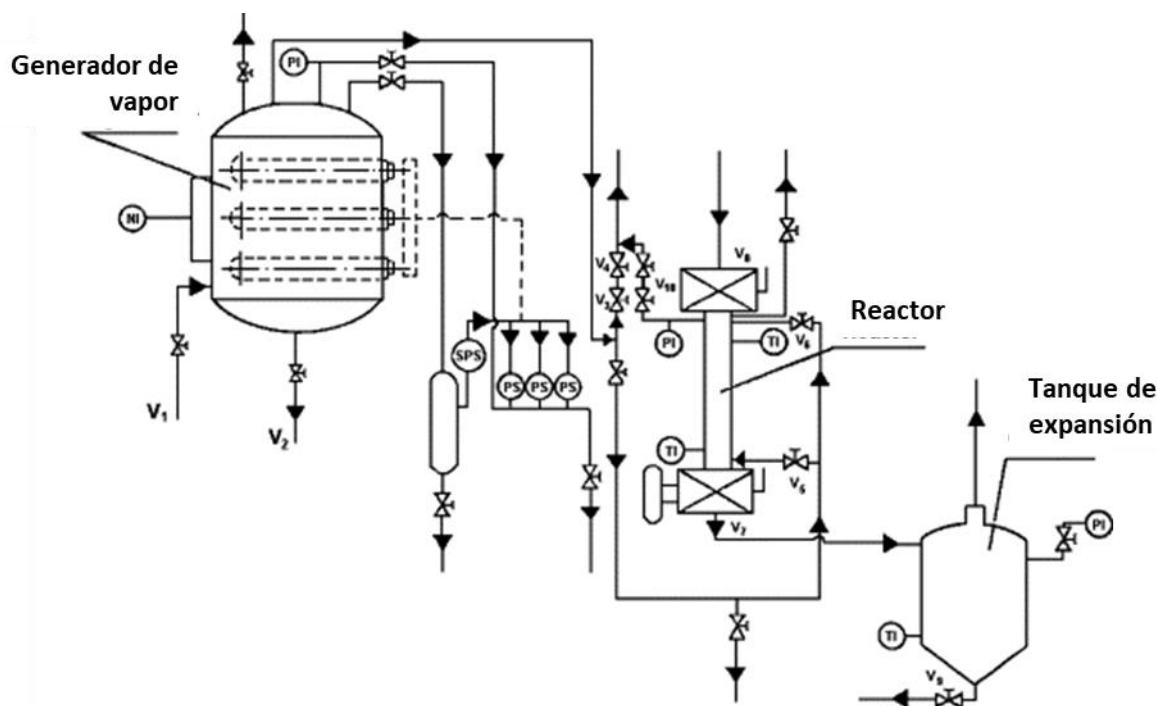


Figura 4-2. Diagrama de flujo para el sistema de explosión con vapor ubicado en la Unidad de Biocarburantes del CIEMAT (Madrid-España).

▪ Definición del intervalo de estudio para las variables de interés

Para definir el intervalo de estudio de las variables de interés en el pre-tratamiento de SE, se estudió el efecto de temperatura, tiempo, y concentración de catalizador (H_2SO_4), sobre la cascarilla de cebada cruda como sale del proceso de fabricación de la cerveza. Para ello, se realizó un experimento cuyos ensayos Pre-SE1 a Pre-SE11 se presentan en la Tabla 4-1.

La variable de respuesta principal fue el rendimiento de extracción de xilosa potencial en el líquido, definido a través de la Ecuación 4-2.

$$\text{Rendimiento de extracción de xilosa potencial en el líquido después del SE} = \left(\frac{\text{gramos de xilosa potenciales extraídos en el líquido}}{\text{gramos de xilosa en la cascarilla de cebada}} \right) \times 100\% \quad (4-2)$$

Adicionalmente se reportó la recuperación de xilosa en el sólido pre-tratado (Ecuación 4-3) y el porcentaje de pérdidas de xilosa (Ecuación 4-4).

$$\text{Rendimiento de recuperación de xilosa en el sólido después del SE} = \left(\frac{\text{gramos de xilosa en el sólido pre-tratado}}{\text{gramos de xilosa en la cascarilla de cebada}} \right) \times 100\% \quad (4-3)$$

$$\text{Porcentaje de pérdidas de xilosa después del SE} = (100\% - \text{Rendimiento de extracción de xilosa en el líquido} - \text{Rendimiento de recuperación de xilosa en el sólido después del SE}) \quad (4-4)$$

Los intervalos de estudio se definieron tomando como referencia reportes de la literatura, pero principalmente, la experiencia de los investigadores del CIEMAT y los resultados de trabajos realizados por la Unidad de Biocarburantes sobre la extracción de la fracción de hemicelulosa en el líquido del pre-tratamiento de otras biomásas como la paja de trigo y de cebada.

Dentro de las variables de estudio se consideró la impregnación del material con un catalizador ácido, ya que esto mejora la extracción de la hemicelulosa en la tecnología del SE y, posteriormente, el rendimiento de la HE de la celulosa en los WIS. Las temperaturas se evaluaron desde 180 hasta 215°C, con tiempos y concentraciones de ácido diferentes (Pre-SE1 a Pre-SE8), buscando, por ejemplo, incrementar la temperatura para reducir el tiempo de exposición de la biomasa y así evitar la degradación de los azúcares hemicelulósicos, o reducir la temperatura y en contraposición aumentar el tiempo de residencia, para así lograr una mayor exposición de la cascarilla de cebada al vapor y extraer más hemicelulosa.

En segunda instancia se evaluaron dos condiciones en las cuales se pretendía mejorar los fenómenos de transferencia de masa y calor asociadas a este pre-tratamiento. En el primero, Pre-SE9 se redujo el tamaño de partícula de la cascarilla de cebada hasta un promedio de 583,7 μm . En el segundo, Pre-SE10 y Pre-SE11 se eliminó un porcentaje de las proteínas por hidrólisis enzimática previo a los ensayos de SE.

Tabla 4-1. Ensayos para definir las condiciones de operación del pretratamiento de la cascarilla de cebada por SE

Características de las condiciones de la cascarilla de cebada evaluadas	Nomenclatura de los ensayos	Condiciones		
		T (°C)	t (min)	Concentración H ₂ SO ₄ (%p/v)
Impregnación con ácido	Pre-SE1	200	10	0
	Pre-SE2	190	5	0,5
	Pre-SE3	190	10	0,5
	Pre-SE4	190	20	0,5
	Pre-SE5	200	5	0,5
	Pre-SE6	205	7,5	0,75
	Pre-SE7	215	4	1,0
	Pre-SE8	215	10	1,0
Molida	Pre-SE9	190	10	0,5
Desproteínizada por pepsina	Pre-SE10	190	10	0,5
	Pre-SE11	180	20	0,5

▪ Estudio de la extracción de hemicelulosa por SE

De acuerdo con los resultados de los ensayos para definir el intervalo de las variables, se usó como materia prima para el estudio definitivo de extracción de la hemicelulosa por SE la cascarilla de cebada previamente desproteínizada con Alcalase® 2.5L. Adicionalmente se tomaron como base los resultados obtenidos en trabajos previos del grupo de investigación de la Unidad de Biocarburantes en el CIEMAT, donde con SE, sobre paja de trigo obtuvieron rendimientos del 60% de xilosa en el líquido de pre-tratamiento, a 180°C por 35 min, y superiores al 75%, impregnado la biomasa con ácido a la misma temperatura, durante 3,5 min (Ballesteros, 2017).

El diseño experimental que se formuló correspondió a un diseño factorial multinivel donde se evaluaron dos factores: temperatura con tres niveles (160, 170 y 180°C) y tiempo con dos niveles (15 y 30 min), la concentración de ácido para impregnar el material se parametrizó en 0,5% p/v.

Este diseño de experimentos contempló entonces seis ensayos, como se observa en la Tabla 4-2. Adicionalmente al diseño experimental planteado, se realizaron dos ensayos más a 170 y 180°C por 30 min, sin la impregnación del material con ácido. El objetivo de estos

fue validar el uso de este catalizador en la liberación de la hemicelulosa en el líquido del pre-tratamiento a estas nuevas condiciones de temperatura y tiempo, ya que en los ensayos que permitieron definir las variables de estudio, no se había realizado la etapa de desproteinización ni eliminación de almidón a la cascarilla original.

Tabla 4-2. Diseño experimental factorial multinivel para los ensayos definitivos del pre-tratamiento de SE sobre la cascarilla de cebada desproteinizada con y sin impregnación de ácido

Condiciones de impregnación del material	Nomenclatura	Temperatura (°C)	tiempo (min)
Impregnada con ácido (0,5% p/v)	SE1	160	15
	SE2		30
	SE3	170	15
	SE4		30
	SE5	180	15
	SE6		30
Sin impregnación	SE7	170	30
	SE8	180	30

Para los resultados del diseño experimental, se realizó análisis de varianza y optimización del diseño experimental utilizando el software StatGraphics Plus 5.0 Enterprise Edition (Statistical Graphics Corporation, Princenton, NY).

4.2.5 Hidrólisis enzimática

La HE se realizó sobre el líquido obtenido después del SE. Estos ensayos se dividieron en dos grandes grupos: en el primero se realizó la HE con enzimas comerciales puras y en el segundo se realizaron ensayos con cocteles enzimáticos comerciales.

▪ Ensayos con enzimas comerciales puras

Para el primer ensayo con las enzimas comerciales puras, se evaluó la viabilidad de hidrolizar dos sustratos diferentes; el primer sustrato correspondió al líquido crudo que se obtuvo directamente del SE (a las condiciones del ensayo realizado en el punto óptimo, 173°C y 15,5 min). El segundo consistió en un líquido con un potencial de azúcares más alto, el cual se obtuvo concentrando el líquido crudo 5,5 veces mediante evaporación al vacío a 50°C, hasta obtener un valor teórico de xilosa ~80g/L. Lo anterior, teniendo en cuenta que, según el planteamiento de la segunda opción de proceso para la producción

de xilitol, se hace necesario antes de la hidrólisis o después de esta, concentrar el líquido obtenido hasta obtener una concentración de sustrato ideal para la fermentación del xilitol.

La Tabla 4-3 muestra la combinación de las enzimas utilizadas para el primer ensayo de HE, junto con su porcentaje de combinación. Para este primer ensayo, se tomó como punto de referencia la mezcla de enzimas empleadas en la hidrólisis enzimática de la fracción de AX extraídos después del tratamiento alcalino, según la primera opción de proceso planteado en la sección 3.2.9 del Capítulo 3. La dosis total de enzimas que se utilizaron para el primer sustrato fue 1,5 mg enzima-proteína/g AX potencial para el líquido crudo y 0,3 mg enzima proteína/g AX potencial para el líquido concentrado 5,5 veces.

Tabla 4-3. Enzimas puras comerciales utilizadas para realizar la HE sobre el líquido crudo obtenido directamente del SE y para el segundo sustrato, líquido concentrado 5,5 veces.

No.	Enzima	Familia	mg enzima proteína/ g AX potencial		Porcentaje de combinación (%)
			Líquido crudo	Líquido concentrado 5,5 veces	
1	endo-1,4- β -xilanasas	GH11	0,05	0,01	3,36
2		GH10	0,54	0,11	37,16
3	α -L-arabinofuranosidasa	GH43	0,12	0,03	8,31
4		GH51	0,22	0,05	15,00
5	β -xilosidasa	GH43	0,07	0,01	4,79
6	α -glucuronidasa	GH67	0,46	0,10	31,38

Después de realizar el experimento descrito en la Tabla 4-3, se realizó el siguiente experimento solamente sobre el líquido concentrado 5,5 veces, variando la combinación de enzimas adicionadas y la dosis. Esta nueva combinación se ajustó con base en la posible estructura y proporción que podrían tener los oligómeros de AX extraídos en este líquido concentrado. El razonamiento que se hizo tuvo en cuenta que como ~84% de la arabinosa después del SE ya se había liberado como azúcar neutro, entonces, las enzimas accesorio tipo α -L-arabinofuranosidasas debían estar en menor cantidad con respecto a las enzimas principales endo-1,4- β -xilanasas y β -xilosidasas. Así se estableció el porcentaje general y específico de enzimas que muestra la Tabla 4-4.

Tabla 4-4. Porcentaje de combinación de enzimas puras adicionadas sobre el líquido concentrado 5,5 veces (ensayo pre-liminar)

Actividad enzimática general	Porcentaje general de combinación (%)	Actividad enzimática específica (familia)	Porcentaje específico de combinación (%)
Endo-1,4- β -xilanasas	20	endo-1,4- β -xilanasas (GH10)	10
		endo-1,4- β -xilanasas (GH11)	10
β -xilosidasas	70	β -xilosidasa (GH43)	70
Accesorio	10	α -L-arabinofuranosidasa (GH43)	3
		α -L-arabinofuranosidasa (GH51)	3
		α -D-glucuronidasa (GH67)	4

Las actividades enzimáticas se dividieron en tres grandes grupos: 1. Actividad endo-1,4- β -xilanasas (20%), 2. Actividad β -xilosidasa (70%) y 3. Actividades accesorio (10%). En el primer grupo se incluyeron las dos enzimas de las familias GH10 y GH11 que se tenían a disposición para hidrolizar la xilosa de la cadena principal, ajustando su cantidad en partes iguales. Se decidió que la enzima β -xilosidasa debía estar en mayor cantidad respecto al resto de las enzimas, ya que la fracción de AX extraídos en el líquido podría encontrarse principalmente como oligómeros solubles presuntamente de DP entre 2-6 unidades de xilosa (Kemppainen et al., 2016; Álvarez et al., 2017), sumado a la caracterización del cromatograma a tiempo cero en el cual se obtuvo 10,80 g/L de xilobiosa y 20,56 g/L de xilosa, corroborándose que el 24,81% de los azúcares se encontraron en forma de DP4-DP2 y el 33,32% en forma de DP>DP4.

Por lo tanto, la actividad enzimática β -xilosidasa se requiere en mayor porcentaje, para lograr que los xilo-oligosacáridos lineales neutros, principalmente el Xyl₂ y Xyl₃, sean hidrolizados hasta monómeros. Esta enzima adicionalmente libera la xilosa del extremo no-reductor de los xilo-oligosacáridos y puede acortar el ácido aldopentaurónico MeGlcA³Xyl₄ hasta el ácido aldotetraurónico MeGlcA³Xyl₃ (Biely et al., 2016). De manera semejante, se espera que las unidades de xilosa que se encuentren en mayor grado de polimerización se reduzcan secuencialmente por la acción de las endo-1,4- β -xilanasas y posteriormente por la β -xilosidasa, lo cual ratifica por qué esta actividad sigue siendo la más importante para hidrolizar todas las fracciones hasta xilosa.

Finalmente, en el tercer grupo se consideró el aporte de tres enzimas accesorio: las enzimas α -L-arabinofuranosidasas, correspondientes a las familias GH43 y GH51 en partes

iguales (3%). Este porcentaje se estableció teniendo en cuenta que en el líquido había tan solo un 16% de arabinosa potencial de hidrólisis. Por lo tanto, aún se requiere de esta actividad enzimática para hidrolizar las sustituciones de arabinosa en la cadena principal o en los oligómeros de cadena más pequeña, para así liberar aún más xilosa. El restante 4% del conjunto de enzimas accesorio se ajustó con la enzima α -glucuronidasa (familia GH67), ya que se detectó también la presencia de ácidos urónicos en la estructura de los AX extraídos con el SE (datos no mostrados), así como se estableció para la fracción de AX extraídos con el pre-tratamiento alcalino (sección 3.3.10).

La dosificación de la mezcla enzimática adicionada por ensayo, se estableció con base en el referente teórico de 0,6 mg mezcla de enzimas/g de sustrato (Meyer, Rosgaard, & Sørensen, 2009; Rasmussen et al., 2012). También se consideraron los resultados obtenidos en el ensayo anterior para una dosis de 0,3 mg enzima-proteína/g AX potencial en el cual se alcanzó tan solo un rendimiento del 40% de liberación de xilosa. Así, la cantidad de catalizador se duplicó.

Después de evaluados los resultados, se estableció una tercera combinación y dosis de enzimas comerciales puras, adicionando esta vez dos enzimas más con actividades específicas estearasas.

La adición de dos nuevas enzimas tipo acetil xilano estearasas y feruloil estearasas se debió a la liberación del ácido acético y ferúlico, del líquido concentrado 5,5 veces a tiempo inicial y final de una muestra del ensayo anterior. Por ende, se estableció la necesidad de adicionar también estas actividades enzimáticas para despolimerizar en mayor proporción los AX solubilizados por el SE hasta xilosa. Esta idea se corroboró con los argumentos teóricos proporcionados por Biely et al., (2016) quienes describieron que todos las tecnologías que no involucran pre-tratamientos alcalinos sobre el fraccionamiento de la biomasa en el contexto de una biorrefinería, generaran hemicelulosas parcialmente acetiladas. Sumado a esto, se ha reportado que en los tratamientos de SE sobre maderas duras, aproximadamente 60% de los residuos de xilosa pueden estar acetilados, una mayor parte de los residuos de Xylp están monoacetilados en la posición 2 o 3 y una porción menor estarán 2,3-di-O-acetilados. La acetilación 3-O frecuentemente acompaña la sustitución 2- de los residuos de Xylp con el MeGlcA, como se observa en la Figura 4-3 (Biely et al., 2016)

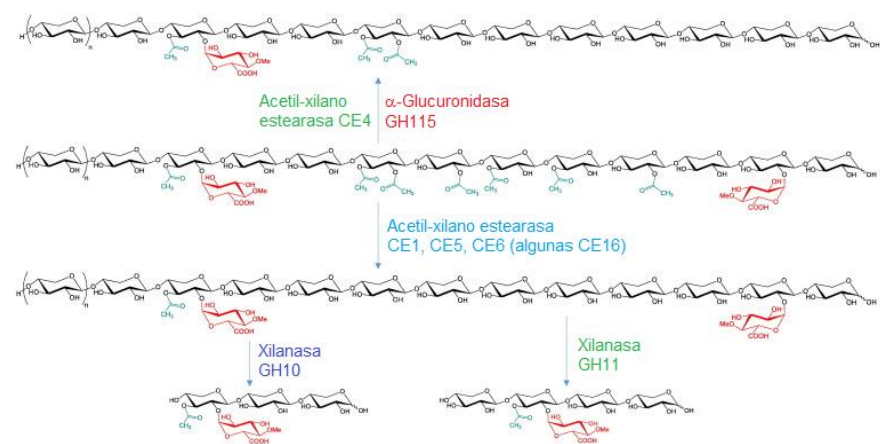


Figura 4-3. Esquema de deacetilación de los acetilglucuronoxilanos (la segunda cadena desde arriba) por las acetil-xilano esterasas de las familias CE 1, 4, 5 y 6 y la degradación posterior de las xilanasas GH10 y GH11. Las acetil-xilano esterasas no atacan el grupo 3-O-acetilo de los residuos sustituidos con MeGlcA. Los residuos de Xylp doblemente sustituidos no sirven como sustrato para las acetilxilano esterasas CE4. Las xilanasas de las familias GH10 y 11 generan los mismos ácidos aldourónicos del xilano acetilado (Figura 1-5; MeGlcA³Xyl₃ and MeGlcA³Xyl₄, respectivamente), pero también aquellos que están 3-O-acetilados en el residuo de Xylp sustituido con MeGlcA (fórmulas en la parte inferior).

Reproducido de Biotechnology Advances, autores: Peter Biely, Suren Singh, Vladimír Puchart, Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art, Copyright 2018, con licencia de Elsevier [4315171486063]

En la Tabla 4-5 se presenta el nuevo porcentaje de la combinación de las enzimas evaluadas.

Tabla 4-5. Porcentaje de combinación de enzimas puras adicionadas a la mezcla de enzimas más dos nuevas actividades enzimáticas tipo esterasas

Actividad enzimática general	Porcentaje grupo enzimas (%)	Actividad enzimática específica (familia)	Porcentaje individual enzimas (%)
Endo-1,4-β-D-xilanasa	20	Endo-1,4-β-D-xilanasa (GH10)	16
		Endo-1,4-β-D-xilanasa (GH11)	4
β-xilosidasas	70	β-xilosidasa (GH43)	70
Accesorio	10	α-L-arabinofuranosidasas (GH51)	2,5
		α-D-glucuronidasa (GH67)	2,5
		Acetil xilano estearasa (CE1)	2,5
		Feruloil estearasa (CE6)	2,5

En la Tabla 4-5 se observa que las endo-1,4- β -xilanasas tienen una cantidad general del 20%, pero se varió el aporte específico de la endo-1,4- β -xilanasas, correspondiente a la familia GH10 al 16% y el restante 4% para la familia GH11, ya que por regla general, las xilanasas GH10 usualmente generan más xilosa que las enzimas GH11 (Biely et al., 2016). El aporte de la actividad β -xilosidasa se mantuvo en el 70%, así como el 10% de las enzimas accesorio. Sin embargo, para este nuevo ensayo se consideró el aporte de las enzimas estearasas. Las cuatro enzimas accesorio se distribuyeron en partes iguales (2,5% para cada una), eliminándose la actividad α -L-arabinofuranosidasa de la familia GH43 por considerarse en los resultados obtenidos previamente para la HE de los AX de la cascarilla de cebada extraídos con el pre-tratamiento alcalino (sección 3.3.12, Capítulo 3) que se podía prescindir de esta enzima. También se evaluaron dos dosis más altas, correspondientes al doble y al triple de la dosis inicial contemplada, así las dosis evaluadas correspondieron a 0,6 (I dosis), 1,2 (II dosis) y 1,8 (III dosis) mg de mezcla de enzimas-proteína/g AX potencial.

Para finalizar los ensayos que contemplan el uso de enzimas comerciales puras, se planteó un último experimento para hacer el seguimiento de formación de producto a través del tiempo que permitiera comparar el comportamiento de las dos dosis potenciales (I y II) encontradas como las mejores en el ensayo anterior, a dos temperaturas diferentes (40 y 50°C). Como se explicó en la sección 3.2.9, la temperatura de reacción para la HE se ajustó a 40°C como un balance de las temperaturas óptimas entre las seis diferentes actividades enzimáticas evaluadas en la mezcla. Sin embargo, algunas enzimas como las endo-1,4- β -xilanasas y la β -xilosidasa reportan en sus fichas técnicas una temperatura óptima de 50°C e inclusive de 60°C (Anexo A), ya que estas enzimas fueron las que se agregaron en mayor cantidad (Tabla 4-5), se analizó si a una temperatura superior se alcanzaría un porcentaje de rendimiento mayor de xilosa, favorecido quizás por la temperatura óptima a la cual actúan particularmente estas dos enzimas. Todos los ensayos se realizaron por duplicado y la diferencia de medias se evaluó por prueba de Tukey.

▪ **Ensayo con cocteles enzimáticos comerciales**

Con la finalidad de evaluar una segunda alternativa de hidrólisis enzimática sobre el líquido concentrado 5,5 veces, se realizaron pruebas con cocteles enzimáticos comerciales. Para los primeros experimentos se emplearon tres enzimas diferentes: Ultraflo L, Celluclast 1.5

L y Viscozyme L de la casa comercial Novozymes (Tabla 4-6 y Tabla 4-7). Estas enzimas se utilizaron individualmente y en combinación entre ellas, como se observa en la Tabla 4-8, en una serie de siete ensayos.

Tabla 4-6. Resumen de las características de los cocteles enzimáticos evaluados

Nombre de la enzima	Principal actividad	Fuente	pH óptimo de la principal actividad	Temperatura óptima de la principal actividad
Celluclast 1.5 L	Celulasa	<i>Trichoderma reesei</i>	4,5-6,0 ^a	50-60 ^a
Ultraflo L	β -glucanasa ^b	<i>Aspergillus niger</i>	6 ^c	40 ^c
Viscozyme L	β -glucanasa ^b	<i>Humicola insolens</i>	3,5-5,5 ^a	25-55 ^a

^a Información proporcionada por las fichas técnicas de Novozymes A/S (Bagsværd, Dinamarca) ^b La preparación de β -glucanasa contiene arabinasa, celulasa, pentosanasa y actividades laterales xilanasa, de acuerdo a las fichas técnicas de Novozymes A/S (Bagsværd, Dinamarca) ^c Información internacional de Novozymes A/S

Reproducido de Enzyme and Microbial Technology, autores: Hanne R. Sørensen, Sven Pedersen, Anne S. Meyer, Synergistic enzyme mechanisms and effects of sequential enzyme additions on degradation of water insoluble wheat arabinoxylan, Copyright 2018, con licencia de Elsevier [4315131466003]

Tabla 4-7. Actividades enzimáticas presentes en los cocteles enzimáticos Celluclast 1.5 L y Ultraflo a pH 5, 50°C

Enzima	Actividad		
	α -L-arabinofuranosidasa	Endo-1,4- β -xilanasa	β -xilosidasa
Celluclast 1.5 L	12,5	45	19,6
Ultraflo L	4,72	43,8	14,8

Reproducido de Enzyme and Microbial Technology, autores: Hanne R. Sørensen, Sven Pedersen, Anne S. Meyer, Synergistic enzyme mechanisms and effects of sequential enzyme additions on degradation of water insoluble wheat arabinoxylan, Copyright 2018, con licencia de Elsevier [4315131466003]

Tabla 4-8. Definición de los ensayos con enzimas comerciales en forma individual y combinada

Ensayo No.	Enzima	Porcentaje de combinación (%)
1	Ultraflo L	100
2	Celluclast 1.5 L	100
3	Viscozyme L	100
4	Ultraflo L+Celluclast 1.5 L	50:50
5	Ultraflo L+Viscozyme L	50:50
6	Celluclast 1.5 L+Viscozyme L	50:50
7	Ultraflo L+Celluclast 1.5 L+Viscozyme L	33,3:33,3:33,3

Después de evaluar la serie de cocteles enzimáticos comerciales del ensayo anterior y no encontrar resultados para la liberación de xilosa en el líquido mayores a 12% de rendimiento, se realizó un segundo ensayo con la enzima comercial de la casa Novozymes, Cellic™ Ctec I, que en ensayos previos de la Unidad de Biocarburantes había dado resultados positivos para la liberación de xilosa en los líquidos obtenidos del SE provenientes de otras biomásas pre-tratadas (Sáez & Álvarez, 2017).

Para ello, los experimentos se realizaron en dos partes: en la primera parte se evaluaron diferentes dosis de la enzima Cellic™ Ctec I en relaciones volumétricas: 1, 2, 3 y 4% volumen de enzima /volumen de líquido, y en la segunda parte se evaluó la suplementación de las dosis anteriores con la actividad enzimática pura β -xilosidasa de la familia GH43 al 0,1 mg/g AX (Sørensen, Pedersen, & Meyer, 2007).

4.2.6 Hidrólisis enzimática de los WIS pre-tratados

Una de las corrientes laterales de proceso obtenida en los ensayos de SE, son los WIS; estos presentan un alto potencial de hidrólisis para obtener fracciones ricas en azúcares simples (ricos en glucosa principalmente). Con el objetivo de valorizar esta corriente en el esquema del proceso planteado dentro del concepto de una biorrefinería, los WIS se hidrolizaron enzimáticamente utilizando un complejo enzimático Cellic™ Ctec II a 15 FPU/mL (Novozymes). La hidrólisis se realizó en buffer citrato 0,1 M, pH 5 a 50°C en Erlenmeyers de 100 mL, en agitación orbital a 150 rpm por 72 horas con una carga de sólidos del 5% (p/v) en base seca. La hidrólisis se realizó por triplicado y los resultados presentados son el promedio de estos.

4.2.7 Fermentación

Para la fermentación se utilizó el mismo microorganismo y procedimiento de producción del inóculo, así como la misma técnica para determinación de biomasa y determinación de k_La , descritas en la sección 3.2.10.

Los ensayos de fermentación para esta opción de proceso se dividieron en dos partes. La primera parte consistió en la evaluación de la toxicidad del líquido obtenido en el SE variando el pH a nivel de matraz Erlenmeyer para el líquido crudo y el líquido 5,5 veces concentrado a un pH de 4,5 y 5,5.

Posteriormente, definida esta variable, se realizó la fermentación en biorreactores de un litro (por duplicado). Como materia prima se usó el líquido obtenido con las mejores condiciones encontradas en el diseño de superficie de respuesta del pre-tratamiento de SE. Este líquido se concentró hasta obtener un valor de sustrato de $\sim 80\text{g/L}$. El líquido concentrado posteriormente se pre-sacarificó con ayuda de la enzima CellicTM Ctec I al 1% v/v suplementada con β -xilosidasa ($0,1\text{ mg/g AX}$) por 24 horas, posteriormente se ajustó el valor de k_{La} de 15h^{-1} en el reactor mediante el método dinámico y se realizó el seguimiento en el tiempo.

4.2.8 Métodos analíticos

▪ Determinación de azúcares, xilitol y arabitol por cromatografía líquida

Se empleó un cromatógrafo líquido Waters 2695 con un detector de índice de refracción y una columna CARBOsep CHO-682 LEAD (Transgenomic, Omaha, NE) operada a 75°C con agua Milli-Q (Millipore) como fase móvil ($0,5\text{ mL/min}$) para cuantificar no solamente los azúcares neutros, sino también los productos de fermentación como xilitol, arabitol y glicerol.

▪ Determinación de ácido acético y fórmico

El ácido acético y fórmico se cuantificaron por HPLC (Waters, Milfors, MA) usando un detector de índice de refracción 410 Water. Se utilizó una columna Aminex HPX-87H (Bio-Rad Labs, Hercules, CA) a 65°C y H_2SO_4 5mM a un flujo de $0,6\text{ mL/min}$ como fase móvil.

▪ Determinación de etanol por cromatografía de gases

El etanol se analizó por cromatografía de gases, usando un sistema GC 7890A (Agilent, Waldbronn, Germany) equipado con un inyector de la serie Agilent 7683B, detector de ionización de flama y una columna Carbowax 20 M a 85°C . La temperatura del inyector y el detector se mantuvo a 175°C .

▪ Determinación de inhibidores de fermentación

Los compuestos fenólicos se analizaron por HPLC (Agilent, Waldbronn, Germany) empleando una columna Coregel 87H3 (Transgenomic, San Jose, CA) a 65°C , equipada

con un detector de arreglo de diodos 1200 (Agilent, Waldbronn, Germany). La fase móvil estaba compuesta de 89% (5mM H₂SO₄) y 11% acetonitrilo con un flujo de 0,7 mL/min.

▪ **Determinación de actividad enzimática proteasa**

La determinación de la actividad enzimática proteasa se realizó siguiendo la metodología del ensayo universal de actividad proteasa, usando caseína como sustrato.

4.3 Resultados y discusión de resultados

4.3.1 Caracterización de la cascarilla de cebada

A la cascarilla de cebada fresca se le determinó su humedad (76,1±1,32%), así como el pH del líquido (mosto) que aún impregnaba al material sólido (3,60). En la Tabla 4-9, se presenta la caracterización de la cascarilla de cebada proveniente de la cervecería Mahou.

Tabla 4-9. Composición de la cascarilla de cebada proveniente de la cervecería Mahou (materia seca, %)

Componente	Contenido(% en base seca)
Glucanos	20,69
Celulosa	15,48 ± 0,4
Almidón	5,21 ± 0,082
Hemicelulosa	19,81
Xilano	13,20 ± 0,47
Galactano	0,33 ± 0,01
Arabinano	5,59 ± 0,01
Manano	0,70 ± 0,01
Lignina	14,01
Ácido insoluble	9,45 ± 0,14
Ácido soluble	4,56 ± 0,43
Extractivos	24,28
Acuosos	11,72 ± 2,11
Orgánicos	12,55 ± 0,60
Grupos acetilo	0,56 ± 0,0015
Proteínas	15,57 ± 0,72
Cenizas totales	3,80 ± 0,05

Como se observa en la Tabla 4-9, la cascarilla de cebada procedente de la cervecería Mahou en España está compuesta por 20,69% de glucanos, distribuidos principalmente en almidón y celulosa. Esto a su vez indica un remanente de 5,21% de azúcares en forma de almidón que no se extrajeron en el proceso de producción de cerveza y, por lo tanto, la celulosa correspondió al restante 15,48%. El almidón presente en esta cascarilla de cebada fue más alto que el encontrado para la cascarilla de cebada de origen colombiano (1,21%) y la de origen finlandés (3,08%) caracterizada por Kemppainen et al., (2016).

La fracción de hemicelulosa fue 19,81%, distribuida principalmente en xilano (13,20%) y arabinano (5,59%). El potencial de producción de xilosa es del 15%, valor ligeramente inferior al potencial encontrado en el lote de la cascarilla colombiana (18,5%).

El contenido total de la lignina fue 14,01% del peso seco, distribuido en 67,5% de ácido-insoluble y 32,5% de ácido-soluble. El primero se determinó como la conocida lignina Klason, pero como este material presentó un alto contenido de proteínas, debió realizarse la corrección del valor, no solamente por las cenizas sino también por las proteínas para estimar el valor real, que fue 9,45%. Este resultado es semejante al valor reportado (10%) para este mismo material pero de origen finlandés (Kemppainen et al., 2016).

Las cenizas totales correspondieron al 3,80%, donde aproximadamente 66% es material inorgánico que puede removerse por el lavado o extracción acuosa de la cascarilla. Los grupos acetilo correspondieron al 0,56%, valor relativamente bajo comparado con el de otras biomásas residuales, como la biomasa de la poda del olivo (2,3%) (Negro et al., 2015), paja de cebada (1,8%) (Duque et al., 2013) y cardo (3,8%) (Ballesteros et al., 2008).

Vale la pena resaltar que esta biomasa tiene un contenido de extractivos acuosos y orgánicos del 24,28%. Del total de estos extractivos 6,60% son oligómeros de glucosa, 40,43% proteína o compuestos nitrogenados y 7,83% cenizas extraídas. Otros azúcares estuvieron presentes en los extractivos acuosos en cantidades traza. La proporción de la fracción de extractivos fue mayor que la reportada para otros residuos agrícolas, como paja de cebada (10,2%) (Duque et al., 2013), pero semejante a la biomasa de la poda del olivo (24,5%) (Negro et al., 2015). El porcentaje de extractivos orgánicos extraídos con etanol (12,55%) fue semejante a los extractivos lipofílicos (11,4%) reportados por Kemppainen et al., (2016).

Los oligómeros de glucosa encontrados en los extractivos acuosos son, seguramente, azúcares residuales que humectan la cascarilla de cebada y que son parte del mosto después del proceso de maceración en la elaboración de la cerveza. Los carbohidratos presentes en este mosto corresponden principalmente a azúcares fermentables como fructosa (4,4% p/v), glucosa (12,5% p/v), maltosa (66,5% p/v) y maltotriosa (16,7% p/v). El mosto también contiene fuentes de carbono no fermentables tales como dextrinas y β -glucanos (Pidcocke, Kreis, Heldt-Hansen, Nielsen, & Olsson, 2009).

Por lo tanto, el contenido total de glucosa potencial de la materia prima fue 30,52%, correspondiente a la suma de glucanos (celulosa, almidón) más los oligómeros solubles de glucosa encontrados en los extractivos acuosos, y que pueden provenir del mosto que humecta a la cascarilla.

La cascarilla de cebada, al ser un co-producto industrial que no tiene las características propiamente estructurales de un material lignocelulósico, presentó cantidades importantes de proteína en su estructura. Esta proteína fue 20,57%, pero corregida por los extractivos fue tan solo 15,57%. Este valor es ligeramente inferior al reportado para la cascarilla de origen finlandés (22,6%) (Kemppainen et al., 2016) y similar al valor encontrado en la cascarilla de origen colombiano (19,32%).

La cascarilla de cebada sufre transformaciones en su composición después del proceso de malteado y extracción de azúcares en la etapa de maceración del proceso cervecero. Celus, Brijs, & Delcour (2006), reportaron que la cascarilla de cebada contiene una menor cantidad de almidón en comparación con la cebada y la malta, y que el contenido de proteína, AX y cenizas es mayor que en la materia prima de origen. Aproximadamente el 65% de las proteínas de la malta son retenidas en la cascarilla de cebada, mientras que alrededor del 35% están presentes en el mosto.

4.3.2 Definición del intervalo de estudio para las variables de interés en el pre-tratamiento de SE

En la Tabla 4-10 se presentan los resultados correspondientes a los ensayos que permitieron definir el intervalo de estudio para las variables de interés definitivas en el SE.

Para el primer ensayo, Pre-SE1, el rendimiento de xilosa en el líquido fue 17,6%, valor ligeramente superior al ~16% como solubilización de xilano reportado por Kemppainen et

al., (2016), bajo las mismas condiciones de reacción (200°C por 10 min). En el ensayo Pre-SE2 se obtuvo un 30,7% de rendimiento de xilosa en el líquido. Las condiciones de extracción fueron 190°C por 5 minutos, adicionándose un catalizador H₂SO₄ al 0,5% p/v. Por tanto, la adición de este catalizador permitió mejorar la extracción de xilosa en el líquido respecto al ensayo Pre-SE1, sin adición de catalizador, e inclusive presentó el mayor porcentaje que los restantes ensayos a mayor temperatura o tiempo, con excepción de la condición en la cual la cascarilla se desproteinizó (Pre-SE3 a Pre-SE9), en los que el rendimiento fue $\geq 30,3\%$.

Tabla 4-10. Rendimiento de xilosa para los ensayos que permitieron definir el intervalo de estudio para el pre-tratamiento de SE

Condiciones de la cascarilla de cebada evaluadas	Nomenclatura de los ensayos	pH	Rendimiento de xilosa (%)		
			Líquido	Sólido	Pérdidas
Impregnación con ácido	Pre-SE1	3,6	17,6	62,9	19,5
	Pre-SE2	3,0	30,7	68,9	0,4
	Pre-SE3	2,6	23,4	66,1	10,5
	Pre-SE4	2,9	15,9	40,5	43,6
	Pre-SE5	2,5	21,6	66,6	11,8
	Pre-SE6	2,2	14,8	53,1	32,1
	Pre-SE7	2,1	11,9	57,8	30,3
	Pre-SE8	2,0	12,4	56,3	31,3
Molida	Pre-SE9	2,6	15,2	69,6	15,2
Desproteinizada pepsina	Pre-SE10	2,2	30,3	23	46,7
	Pre-SE11	2,0	36,0	32	32,0

Los resultados de los ensayos Pre-SE3 (190°C por 10 min) y Pre-SE4 (190°C por 20 min) demostraron que tiempos más largos de reacción a esta temperatura disminuían el rendimiento de xilosa en el líquido: 23,4% contra 15,9% respectivamente. Este comportamiento puede explicarse por la degradación de estos azúcares hemicelulósicos sometidos a un mayor tiempo de residencia, lo que se evidenció además en el porcentaje de pérdidas para estos dos ensayos.

Para los ensayos Pre-SE5 a Pre-SE8, en los que se incrementó la temperatura de 200 hasta 215°C con tiempos y concentraciones de ácido diferentes, los rendimientos fueron de máximo 21,6% (Pre-SE5). Estos resultados siguieron demostrando la dificultad de extraer

la hemicelulosa en el líquido por SE sobre la cascarilla de cebada. Álvarez et al., (2017) obtuvieron rendimientos del 36% de xilano en el líquido sobre paja de trigo a 200°C por 4 min. Sin embargo, ratificaron el efecto de la adición de catalizador, ya que Kemppainen et al. (2016) a 200°C por 5 minutos y 200°C por 10 minutos sin adición de ácido lograron tan solo el 10 y ~16% respectivamente, de recuperación de xilano sobre la misma biomasa.

Teóricamente, la degradación de los azúcares hemicelulósicos: xilosa y arabinosa, comienza a temperaturas cercanas a 195°C. Por lo tanto, existe una competencia entre la hidrólisis efectiva de los carbohidratos y su degradación excesiva (Duque et al., 2016) (Kemppainen et al., 2016), lo que a su vez explica por qué para las tres temperaturas superiores a los 190°C los rendimientos de xilosa en el líquido fueron inferiores al 30,7%. Sin embargo, Shindo & Tachibana, (2006), reportaron que pudieron solubilizar 60 g de azúcares a partir de 215 g de cascarilla de cebada por SE a condiciones de 235°C por 1 min, lo que significa una recuperación del 50% de los azúcares, suponiendo un 40-50% de contenido promedio de azúcares.

El alto contenido de proteína en la cascarilla de cebada también puede tener una incidencia en la degradación de los azúcares durante el SE. Pueden ocurrir reacciones de Maillard debido a la presencia de proteínas y carbohidratos durante la exposición al calor, cambiando la solubilidad de los componentes tanto en el líquido como en el sólido pre-tratado (Kemppainen et al., 2016), siendo más favorecidas para los azúcares reductores tipo pentosas (xilosa y arabinosa) y temperaturas elevadas. Adicionalmente, estas reacciones pueden generar compuestos que causan el entrecruzamiento de las proteínas y por ende la reducción en la transferencia de masa y calor por las propiedades asociadas a la gelificación de estas proteínas que se entrecruzan.

En el ensayo Pre-SE9 se pretendía verificar si a un menor tamaño de partícula de la biomasa se lograrían incrementar las velocidades de transferencia de masa y calor, y esto se vería reflejado en una mayor extracción. Sin embargo, el rendimiento alcanzado para el ensayo fue de tan solo 15,2%, valor inferior al obtenido sin la etapa de molienda a las mismas condiciones Pre-SE3 (24,3%). Por tanto, se evidenció que no era necesario disminuir el tamaño de partícula de la cascarilla de cebada. Este resultado, corresponde a una ventaja técnica y económica futura de este pre-tratamiento ya que no son necesarias las etapas de secado y molienda de la materia prima previo al SE.

Finalmente, teniendo en cuenta la apariencia cualitativa del *slurry* y sus características físico-químicas después de los nueve pre-tratamientos, se analizó que la presencia de la proteína, así como del almidón remante, tenían, posiblemente un efecto negativo, al generar una barrera tanto física como química en la transferencia de calor y masa del vapor hacia las fibras de la cascarilla de cebada. Las razones son la gelificación de la proteína, gelatinización y/o retrogradación del almidón, así como por ejemplo la presencia de cutina en la materia prima (Kemppainen et al., 2016) ya que, la composición de la biomasa ha demostrado tener una influencia en la eficacia del pre-tratamiento (Duque et al., 2016).

El rendimiento de xilosa extraído en el líquido para los dos ensayos con la cascarilla de cebada desproteinizada Pre-SE10 (190°C por 10 min) y Pre-SE11 (180°C por 20 min), impregnando de nuevo la cascarilla desproteinizada con 0,5% p/v de H₂SO₄, mostraron un 30-37% de rendimiento, resultados semejantes y levemente superiores al máximo encontrado en el ensayo Pre-SE2, realizado con la cascarilla de cebada original sin desproteinización. El rendimiento de extracción de proteínas, correspondió a un 37,19% (aplicando la Ecuación 4-1 para el ensayo con la pepsina comercial).

Posiblemente, como se observa en la Figura 4-4, la proteína hidrolizada después de la hidrólisis enzimática con la pepsina, no podría formar una matriz tridimensional como un gel, lo que eliminó en gran medida la “barrera” generada por la proteína para la transferencia de calor y masa del vapor hacia la cascarilla de cebada, y por esto el rendimiento de solubilización de los AX fue mejor en comparación con los demás ensayos.

Finalmente, esto demostró las ventajas técnicas de la etapa previa de desproteinización de la cascarilla de cebada, no solamente para validar parte de la hipótesis formulada en esta investigación respecto al efecto del pre-tratamiento sobre la extracción de la fracción de hemicelulosa en el líquido, sino que adicionalmente permitiría valorizar una de las fracciones más representativas de esta biomasa como lo es la proteína, con las ventajas asociadas a un proceso biotecnológico.

Estos resultados coinciden con la conclusión de Rommi et al., (2018) quienes aseveran que la solubilización de las proteínas de la cascarilla de cebada, debe realizarse en una etapa previa al SE para evitar las posibles reacciones químicas tales como la desnaturalización de las proteínas y la degradación que ocurre a elevadas temperaturas. Adicionalmente, el uso de las enzimas presenta varias ventajas importantes en proceso para obtener compuestos derivados de la proteína en el líquido como los oligopéptidos, péptidos y/o

aminoácidos, los cuales se espera no deberían sufrir mayores degradaciones o pérdida de sus propiedades funcionales, lo cual en el contexto de una biorrefinería alrededor de la valorización de esta biomasa co-producto del proceso cervecero sería bastante interesante en un futuro.

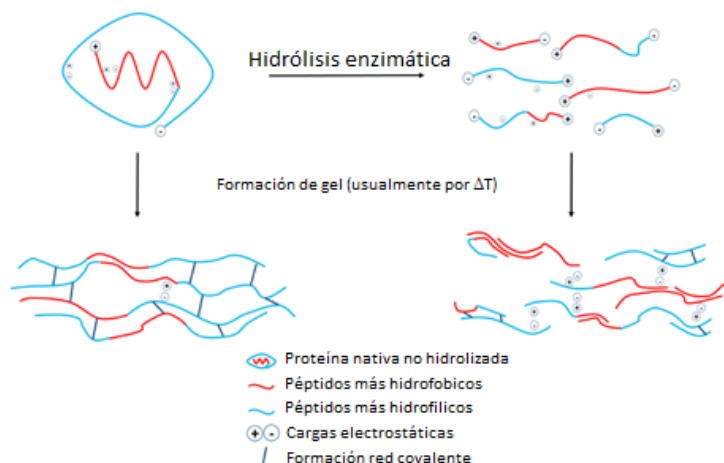


Figura 4-4. Representación esquemática de la gelificación de proteínas y efecto de la hidrólisis enzimática sobre las mismas. La gelificación a menudo es inducida por un proceso térmico, donde la proteína nativa se desnaturaliza y puede formar una red que se mantiene unida mediante enlaces covalentes, interacciones iónicas e interacciones hidrofóbicas. Estas dos últimas interacciones pueden verse favorecidas por la hidrólisis enzimática, pero la capacidad de formación de la red de proteínas suele estar ya muy alterada debido a una disminución en la masa molecular promedio (Wouters, Rombouts, Fierens, Brijs, & Delcour, 2016)

Reproducido de Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, autores: Arno G.B. Wouters, Ine Rombouts, Ellen Fierens, Kristof Brijs, Jan A. Delcour, Relevance of the Functional Properties of Enzymatic Plant Protein Hydrolysates in Food Systems, Copyright 2018, con licencia de John Wiley and Sons [4307111381676]

4.3.3 Desproteinización y eliminación de almidón

El mayor rendimiento de extracción de xilosa en los ensayos del SE se alcanzó para la cascarilla de cebada que se desproteinizó enzimáticamente con la pepsina (Pre-SE11). Esto indicó la necesidad de realizar una etapa de desproteinización a la cascarilla de cebada previo al sometimiento del SE.

Los ensayos de desproteinización por acción de la Alcalase 2.5 L a nivel laboratorio, realizados para definir el pH de la operación se observan en la Figura 4-5. Para la reacción a pH 7,0, el pH disminuye ligeramente, entre el tiempo cero y la primera hora (6,91 a 6,65),

incrementa levemente entre la primera y la segunda hora, y permanece estable durante la tercera hora y finalmente aumenta en la cuarta hora. El ensayo control (sin adición de enzimas) al mismo pH mostró un comportamiento semejante.

El ensayo a pH 8,5 mostró que del tiempo cero a la primera hora de reacción el pH disminuyó casi una unidad y desde la primera hora hasta la cuarta hora se incrementa paulatinamente hasta un pH superior al ajustado (8,8). El ensayo control a este pH presentó un comportamiento semejante. De manera general, para esta reacción enzimática, la primera hora de reacción es la hora crítica en la cual debe tenerse un mayor control del pH, en mayor medida para la reacción a pH 8,5 respecto al pH 7,0.

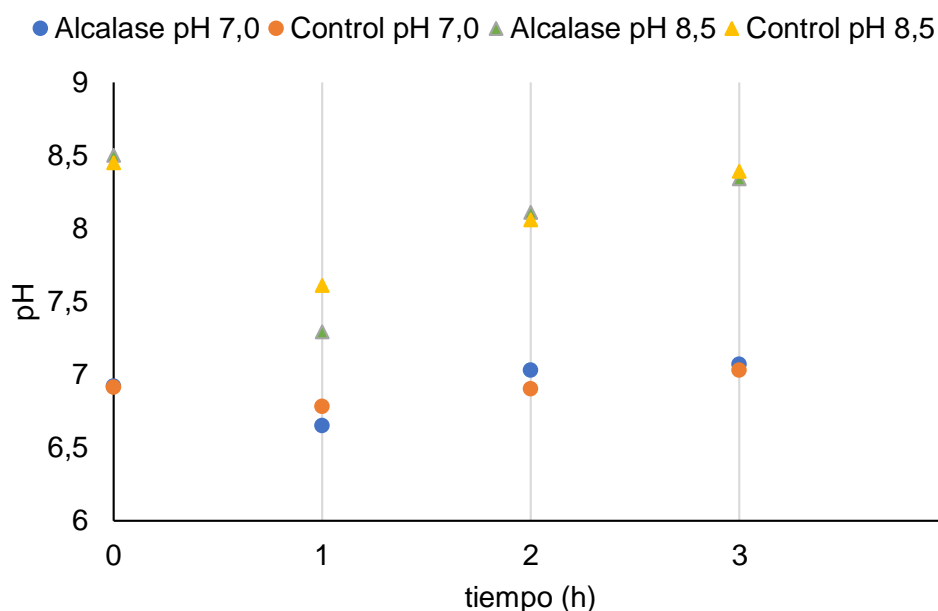


Figura 4-5. Variación del pH durante la hidrólisis enzimática de la cascarilla de cebada empleando Alcalase® 2.5 L a nivel de laboratorio a 60°C, 10% p/p de carga de sólidos y 200 rpm.

El rendimiento de desproteinización fue ligeramente mayor para el ensayo a pH 7,0 (72,62%) respecto al ensayo a pH 8,5 (68,01%). En los controles se alcanzó máximo un rendimiento de 54,99% para el pH 7,0 y 40,07% para el pH 8,5 (Figura 4-6), demostrándose que entre el 40-55% de las proteínas pueden ser extraídas sin adición de enzimas. A estas condiciones de temperatura y pH, la adición de la Alcalase® 2.5 L incrementa la hidrólisis enzimática de las proteínas no solubles de la cascarilla de cebada en por lo menos 20 a 30%, de acuerdo al pH empleado.

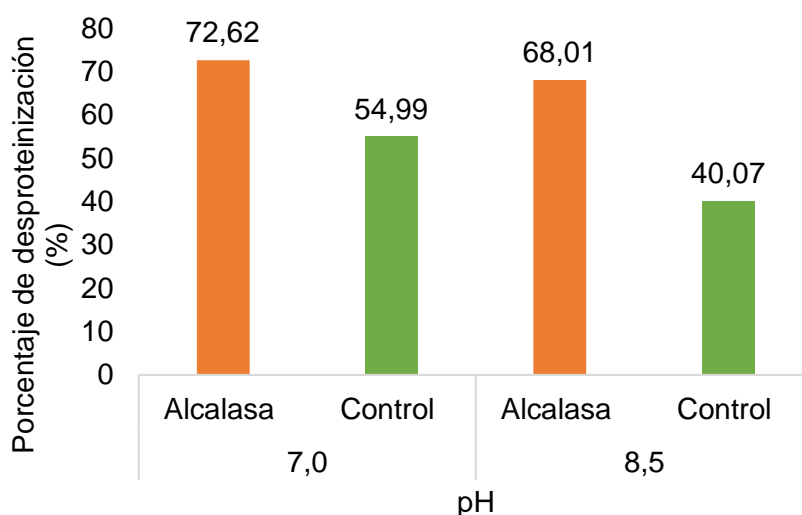


Figura 4-6. Rendimiento de desproteínización para la hidrólisis enzimática de cascarilla de cebada con Alcalase® 2.5 L a nivel de laboratorio a 60 °C, 10% de carga de sólidos y 200 rpm.

Los resultados obtenidos en esta etapa del proceso, coinciden con lo reportado por Treimo, Aspmo, Eijsink, & Horn, (2008), quienes evaluaron la solubilización enzimática de las proteínas de la cascarilla de cebada con varias preparaciones de peptidasas comerciales. Encontraron que la Alcalase fue la peptidasa más efectiva para solubilizar las proteínas de la cascarilla, con capacidad de liberar hasta el 77% de la proteína total. Los análisis de composición de los aminoácidos mostraron, adicionalmente, que los tratamientos con la Alcalase solubilizaron principalmente prolina y glutamina (constituyentes principales de las hordeínas de la cebada) de una manera ligeramente más efectiva que los otros aminoácidos de la cascarilla de cebada.

Los resultados hallados en esta investigación, son similares a los reportados por Niemi et al., (2013) y Rommi et al., (2018). Estos últimos concluyeron que los rendimientos experimentales de extracción de la proteína sobre la cascarilla de cebada fueron entre 45 y 65%, mientras que los rendimientos teóricos están entre 85 y 100%. La diferencia se debió, presuntamente, a la alta capacidad de retención de agua de la cascarilla de cebada. En otras palabras, solo una parte del agua presente en la reacción de hidrólisis se recupera por la centrifugación, resultando en bajos rendimientos reales. En la desproteínización del salvado de arroz, por ejemplo, se han reportado hidrolizados con un porcentaje de

extracción de 81% y 88% de las proteínas empleando también enzimas comerciales como la Alcalase 2.4L al 0.5% y Flavourzyme (Sari, Mulder, et al., 2015).

Con base en estos resultados, se seleccionó el pH de 7,0 para llevar a cabo la desproteinización del material que se sometería a los ensayos definitivos de SE, no solamente porque se obtuvo un mayor valor de rendimiento, sino porque este pH permite garantizar que las enzimas amilasas puedan actuar parcialmente en el proceso de eliminación de almidón, que se realizó de manera simultánea con la desproteinización.

Eliminar el almidón se consideró como una etapa previa importante para la producción de xilitol, teniendo en cuenta que la glucosa podría ser una fuente primaria de carbono para el crecimiento del microorganismo y no la xilosa, utilizándose como nutriente para la generación de biomasa en la primera etapa de adaptación del microorganismo al medio (ventaja de proceso). Sin embargo, para lograr esto sería necesario establecer las condiciones óptimas de concentración de oxígeno disuelto para favorecer el metabolismo de la levadura y lograr que la glucosa se consumiera primero en la fase de adaptación antes que la xilosa.

Si las condiciones de oxígeno disuelto se adecuan solamente en la etapa de fermentación para favorecer la obtención de xilitol, el microorganismo consumiría esta glucosa primero para producir, por ejemplo, etanol y esto tendría varias consecuencias como ralentizar el consumo de xilosa y por ende ralentizar la producción de xilitol. Incluso, el etanol podría ser inhibitorio para el microorganismo. Por lo tanto, la etapa simultánea de HE del almidón residual en la cascarilla de cebada después del proceso de la elaboración de la cerveza, permitiría recuperar también la glucosa en el medio líquido después del proceso de desproteinización y así se tendría una corriente adicional no solamente enriquecida en las fracciones derivadas de la hidrólisis de la proteína, sino que también se tendría un medio rico en glucosa y se disminuiría esta fracción en el sólido desproteinizado.

En la Tabla 4-11 se presentan los azúcares neutros extraídos en el líquido después de la desproteinización en el reactor de 40 L, los cuales correspondieron mayoritariamente a glucosa, como se esperaba. La caracterización de la cascarilla de cebada desproteinizada se presentará en la sección 4.3.4.

El rendimiento de extracción de las proteínas para los ensayos realizados en el reactor de 40 L fue de 63,9%, valor inferior al alcanzado en los ensayos realizado en matraz

Erlenmeyer a las mismas condiciones (72,62%), debido principalmente a la reducción de la velocidad de los fenómenos de transporte asociados al cambio de escala.

Tabla 4-11. Azúcares neutros obtenidos en el líquido resultante de la desproteización de la cascarilla de cebada, ensayo en reactor de 40 L

Azúcar	Concentración (g/L)
Glucosa	11,4
Xilosa	0,35
Galactosa	0,092
Arabinosa	0,204

4.3.4 Caracterización de la cascarilla de cebada desproteizada

Después de la etapa de desproteización y eliminación del almidón realizado enzimáticamente, se caracterizó la cascarilla de cebada desproteizada, que es la nueva materia prima que se utilizaría para los siguientes ensayos de SE y por ende la base para las posteriores etapas de hidrólisis enzimática y fermentación hasta xilitol. En la Tabla 4-12, se presenta la caracterización de la cascarilla de cebada desproteizada.

Tabla 4-12. Composición de la cascarilla de cebada desproteizada (materia seca, %)

Componente	Contenido (% base seca)
Glucanos	18,05
Celulosa	17,07 ± 0,20
Almidón	0,98 ± 0,0854
Hemicelulosa	24,40
Xilano	16,81 ± 0,08
Galactano	1,35 ± 0,03
Arabinano+Manano	6,23 ± 0,10
Lignina	12,82
Ácido insoluble	9,68 ± 0,04
Ácido soluble	3,14 ± 0,06
Extractivos	26,29
Acuosos	13,14 ± 1,10
Orgánicos	13,15 ± 0,64
Grupos acetilo	0,93 ± 0,0279
Proteínas	8,68 ± 0,10
Cenizas totales	2,44 ± 0,022

Como se observa en la Tabla 4-12, el porcentaje de glucanos disminuye principalmente por la eliminación del almidón, cuyo contenido se reduce de 5,21 a 0,98% respecto a la materia prima original. A su vez la celulosa se concentra y pasa a ser casi el 100% de la fracción de glucanos en este material desproteinizado. La hemicelulosa también se concentra, principalmente la fracción de xilano, que aumenta de 13,20 a 16,81%. La lignina disminuye debido principalmente a la reducción de la fracción ácido soluble, ya que la fracción ácido insoluble permanece casi constante, respecto al valor original.

Los extractivos se concentraron ligeramente, aunque el porcentaje de glucano en el agua extraída disminuye a un 3,11%, debido principalmente a la acción de las enzimas Spiryzime® y Termamyl®, que logran retirar una gran proporción no solamente del almidón presente, sino también de los oligómeros de glucanos, susceptibles de hidrólisis. Por lo tanto, la glucosa potencial en este material desproteinizado ahora disminuye al 23,52%, los grupos acetilos se concentran aproximadamente al doble del material original (0,93%) y las cenizas totales se reducen aproximadamente un tercio debido a la solubilización que sufren en la etapa de desproteinización y eliminación del almidón. Finalmente, la fracción que más se afecta corresponde a la proteína, esta disminuye a un valor de 8,68% (corregida por los extractivos), correspondiente a un 12,3% de proteína total, después de lograrse un 63,9% de extracción de esta fracción del material original por acción de la Alcalase® 2.5 L en la etapa de desproteinización.

4.3.5 Pre-tratamiento de explosión con vapor

En el Anexo H se presenta el valor de pH obtenido en el líquido de pre-tratamiento, la concentración de azúcares neutros libres y totales para los ocho ensayos realizados. El pH de los ensayos sometidos a impregnación con ácido varió en el intervalo de 2,1-2,8, donde se observó un ligero incremento del pH con el tiempo de residencia. Para los dos ensayos (SE7 y SE8) sin impregnación el valor fue 5,9, el pH de estos dos últimos ensayos disminuyó levemente, ya que la cascarilla que se alimentaba en el momento del pre-tratamiento había sido sometida previamente a la etapa de desproteinización y eliminación del almidón y allí el pH óptimo para la reacción enzimática se ajustó a 7,0, lo que demuestra que después del pre-tratamiento por SE el medio se acidifica ligeramente debido a la auto-hidrólisis realizada por los grupos acetilo liberados a las condiciones de reacción.

En la Figura 4-7 se representan el porcentaje de los azúcares neutros libres y azúcares neutros totales potenciales de hidrólisis de los líquidos. En cuanto a las concentraciones de azúcares neutros libres se encontró que para la temperatura de 170 (SE3 y SE4) y 180°C (SE5 y SE6) logró solubilizarse en mayor proporción los tres azúcares principales (glucosa, xilosa y arabinosa), en comparación con la temperatura de 160°C (SE1 y SE2). Es de resaltar que el mayor porcentaje que se encontró de glucosa libre (Figura 4-7 A) correspondió al 39% tanto para el ensayo SE3 (170°C por 15min), como SE6 (180°C por 30min), el efecto del factor tiempo no tuvo una incidencia significativa en la solubilización de este azúcar a las condiciones evaluadas.

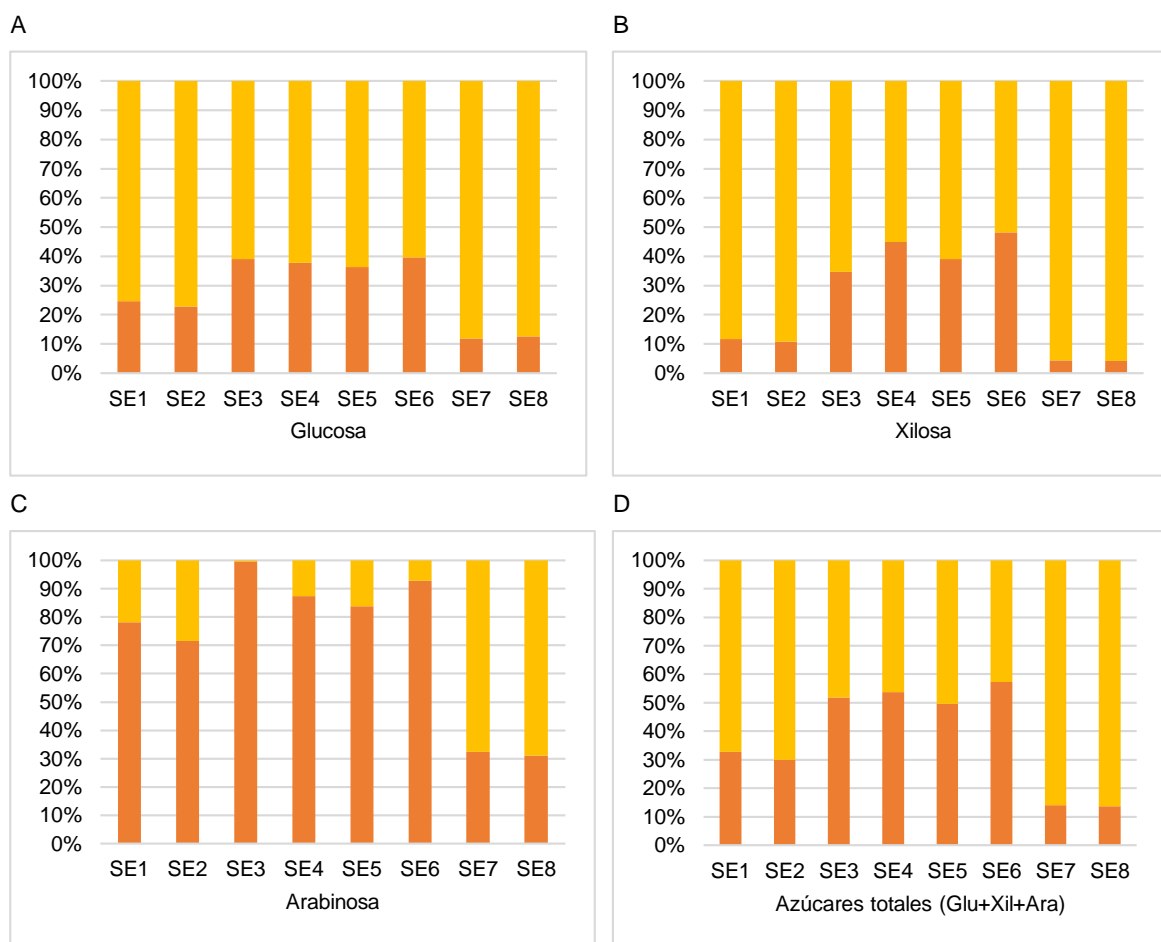


Figura 4-7. Porcentaje de azúcares libres (barras naranja) y azúcares neutros potenciales totales para hidrólisis (barras amarillas) obtenidos en el líquido de pre-tratamiento de la cascarilla de cebada desproteinizada sometida al SE, (A) Glucosa, (B) xilosa, (C) arabinosa y (D) azúcares totales (Glu+Xil+Ara)

Para el porcentaje de xilosa libre en el líquido (Figura 4-7 B), se encontró que el mayor valor correspondió a 48,19% para el ensayo SE6 (180°C por 30min), aunque se presentó un valor cercano de 44,83% para el ensayo SE4 (170°C por 30 min), de nuevo la mayor recuperación de xilosa como azúcar libre se dio para los ensayos a temperaturas de 170 y 180°C donde a su vez se obtuvo un ~10% más de recuperación para el tiempo de 30 minutos en comparación con el tiempo de 15 min.

Por último, se evidencia que el porcentaje de arabinosa (Figura 4-7 C) que se encuentra en el líquido como azúcar libre es superior al 70% para los ensayos a 160°C, mientras que para las temperaturas de 170 y 180°C se encontraron porcentajes superiores al 80% e inclusive cercanos al 100% para el ensayo SE3 (170°C por 15 min), aunque cabe destacar que estos porcentajes podrían estar sobre-estimados ligeramente por la termolabilidad que presenta este azúcar a la temperatura y tiempo de reacción en el procedimiento de la hidrólisis ácida, sumado a las reacciones de Maillard que podrían suceder por la presencia de compuestos nitrogenados en el medio de reacción.

Estos resultados indican que para los tres azúcares se obtienen porcentajes de de azúcares simples importantes, siendo superiores los valores encontrados para la arabinosa, seguido de la xilosa y en último lugar la glucosa, donde puede encontrarse una distinción clara entre la temperatura de 160 con las de 170 y 180°C, obteniéndose a su vez mejores resultados a las temperaturas más altas, mientras que con el factor tiempo solo se observó una tendencia de incremento a mayor tiempo de residencia para la extracción de la xilosa, en la glucosa no se observó ningún efecto y en la arabinosa el tiempo de 30 minutos arrojó porcentajes de azúcares libres ligeramente inferiores al tiempo de 15 minutos, debido a la degradación que podía sufrir este azúcar a mayores tiempos de residencia. Estadísticamente, según el ANOVA solamente el factor correspondiente a la temperatura tuvo una incidencia significativa en la solubilización de la xilosa y glucosa en el líquido ($p < 0,05$), mientras que el factor tiempo no tuvo ninguna incidencia significativa en esta variable de respuesta para ninguno de los tres azúcares analizados (Anexo I).

Si se comparan los resultados del porcentaje de azúcares neutros libres en el líquido del pre-tratamiento con la cascarilla sin impregnación con ácido, se evidencia que no hay una tendencia marcada a las dos temperaturas evaluadas, pero sí que el porcentaje disminuye drásticamente para los tres azúcares, por ejemplo, solo se alcanza un porcentaje de recuperación de azúcares neutros libres de ~12% para la glucosa, ~4,3% para la xilosa y

~32% para la arabinosa. Cabe destacar que la arabinosa es el azúcar que se solubiliza mayoritariamente como azúcar neutro libre tanto en los ensayos con y sin impregnación con ácido, ya que el enlace glucosídico alfa de la arabinosa en la cadena principal de xilosas en la estructura de los AX, es el enlace más termolábil, susceptible de romperse más rápidamente a estas condiciones de temperaturas y acidez del medio.

Por otra parte, si se analiza el porcentaje total de los principales azúcares potenciales para hidrolizarse en la fracción líquida en la etapa posterior de hidrólisis enzimática, se encuentra que más del 60% de la glucosa (Figura 4-7 A) está en el líquido como glucanos, donde puede aseverarse que principalmente puede ser celulosa que se ha alcanzado a extraer después del pre-tratamiento y/o el remanente de oligómeros de glucosa que son susceptibles de extracción a partir de la cascarilla de cebada desproteinizada, ya que la fracción de almidón se hidrolizó casi completamente en la etapa previa de desproteinización y eliminación de almidón. En cuanto a la biomasa que no se impregnó con ácido el porcentaje total de glucosa que es susceptible de hidrólisis correspondió al 90%.

Como el principal objetivo de este pre-tratamiento fue la extracción principalmente de la fracción de hemicelulosa en el líquido, para su posterior hidrólisis enzimática, es de resaltar que el porcentaje de xilosa que tiene un potencial de hidrólisis se encuentra entre el 50%-65% para los ensayos realizados a 170 y 180°C (Figura 4-7 B), llegando a incrementarse hasta ~90% para los ensayos a 160°C, por tanto escoger la temperatura de tratamiento entre 170 y 180°C tiene ventajas técnicas en la posterior etapa de hidrólisis al requerirse posiblemente una menor cantidad de enzimas endo-1,4- β -D-xilanasas y β -xilosidasas, ya que estos líquidos presentaron porcentajes solamente de 35 hasta 50% de xilosa libre en el líquido.

Por lo tanto, cabe resaltar que una de las principales ventajas que se encontró en este tratamiento es que el porcentaje de arabinosa remanente para hidrólisis en el líquido varió en tan solo el 1-16% para los ensayos a 170 y 180°C y se incrementó al 21-28% para los ensayos a 160°C (Figura 4-7 C). Se destaca entonces este porcentaje de arabinosa remanente o potencial de hidrólisis, ya que, si se piensa en la siguiente etapa del proceso, el tener casi el 90% de la arabinosa libre en el líquido, implica que puede prescindirse de agregar cantidades importantes de las actividades enzimáticas tipo α -L-arabinofuranosidasas, las cuales son necesarias para romper los enlaces glucosídicos de

este azúcar a la cadena principal de AX y así obtener un buen porcentaje de rendimiento de xilosa en el líquido, lo cual no solamente presentaría ventajas técnicas de proceso, sino también ventajas económicas. Además, podría pensarse que la ruptura de la arabinosa de la cadena principal de xilosas podría disminuir la resistencia del polisacárido a la acción de las enzimas, debido a que una alta densidad de las ramificaciones, podrían bloquear la formación de los complejos productivos de la enzima-sustrato en la posterior HE.

Con lo anterior se sigue corroborando que la impregnación del material con ácido previo al SE, como se observa principalmente para la arabinosa y en menor medida para la xilosa solubilizadas en el líquido (dependiendo de la temperatura de tratamiento) en comparación con los ensayos SE-7 y SE-8 que no se impregnaron con ácido y que presentaron tan solo un 30% de arabinosa libre, favoreció la liberación de los azúcares hemicelulósicos en el líquido del pre-tratamiento.

Finalmente, en la Figura 4-7 D se resume el porcentaje de azúcares neutros libres como la suma de la glucosa, xilosa y arabinosa respecto a los azúcares neutros totales potenciales que se solubilizaron en el líquido del pre-tratamiento. En conclusión, el mayor porcentaje de azúcares libres se obtuvo para las temperaturas de 180 y 170°C en comparación con la de 160°C y con los ensayos sin impregnación con ácido (SE7-SE8). El mayor porcentaje de azúcares neutros totales potenciales para hidrólisis se encontraron entonces en los líquidos de los ensayos que no se impregnaron con ácido ~85% seguido del 70% para la temperatura de 160°C y entre un 42-50% para las temperaturas de 170 y 180°C del material impregnado con ácido, el factor del tiempo para estas variables de respuesta no tuvo ninguna incidencia significativa desde el punto de vista estadístico (Anexo I).

En la Figura 4-8, se presentan los porcentajes de recuperación de los sólidos solubles (WSS) e insolubles (WIS), así como el porcentaje de pérdidas de la biomasa. Del análisis para los seis ensayos en los cuales la biomasa se impregnó con ácido, se evidencia que para el ensayo SE4 (170°C por 30 min) se logró solubilizar en mayor proporción la cascarilla de cebada con un 32,9% de WSS, aunque este porcentaje correspondió a un valor muy semejante del otro ensayo que se sometió a 170°C por 15 min (SE3) y a los dos sometidos a 180°C, para la temperatura de 160°C se obtuvo un 26,7% de solubilización de los sólidos, sin observarse diferencias marcadas para los dos tiempos de residencia evaluados, lo cual se corroboró con el análisis estadístico, en este ninguno de los dos factores evaluados tuvo un efecto significativo en esta variable de respuesta (Anexo I).

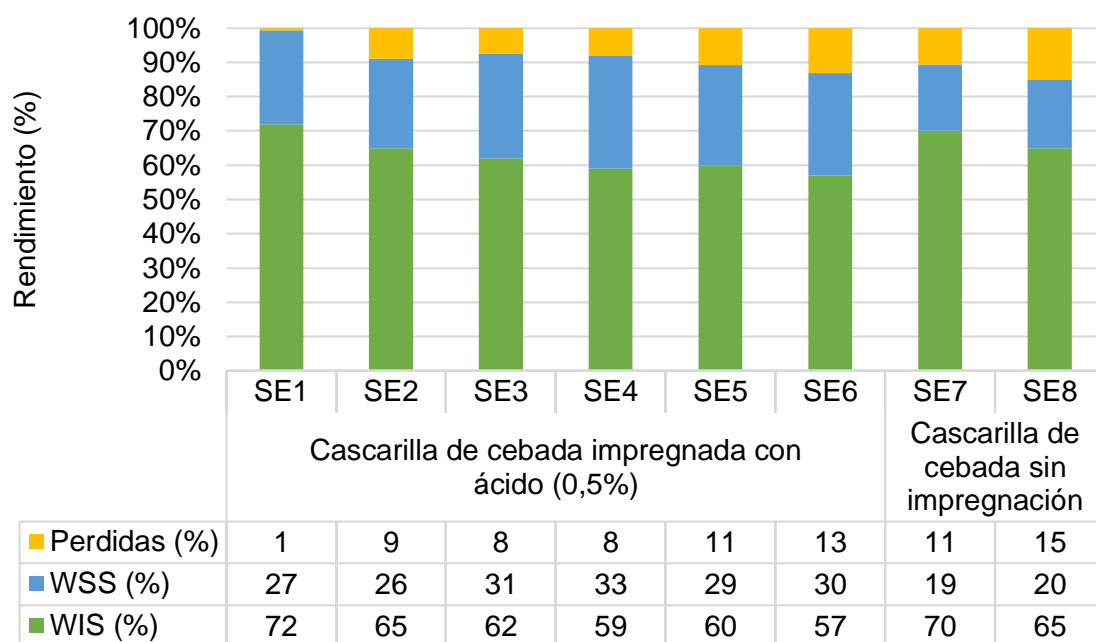


Figura 4-8. Rendimiento de recuperación de los sólidos WSS (barras azules), WIS (barras verdes) y pérdidas (barras amarillas)

La recuperación de la biomasa como WIS en términos generales fue ligeramente menor para los ensayos a condiciones de mayor tiempo de residencia. En cuanto al porcentaje de pérdidas, se ve un incremento de este con el aumento en la temperatura y el tiempo de pre-tratamiento, este porcentaje de pérdidas varió del 0,7 al 13,2% para los primeros seis ensayos (SE1-SE6). Las pérdidas pueden ocurrir principalmente a través de la manipulación del material en los diferentes recipientes de operación para realizar las medidas, hasta pueden estar asociadas a los finos (propios y generados en el pre-tratamiento), durante la separación del slurry, en el lavado de los sólidos o quizás por la volatilización de algunas sustancias, inclusive debido a la degradación de algunos componentes.

Para los ensayos realizados sin impregnación con ácido se observa la recuperación de los WSS fue menor en comparación con los ensayos catalizados con ácido, pero entre ellos no se observaron diferencias significativas para las dos temperaturas evaluadas (19 y 20% respectivamente). Para la recuperación de WIS y en el porcentaje de pérdidas del material luego del pre-tratamiento, si se observaron pequeñas diferencias, por ejemplo, la recuperación de los WIS a 170°C (70%) fue levemente superior a la temperatura de 180°C

(65%). De manera general, el porcentaje de pérdidas fue semejante al obtenido para los ensayos SE5 y SE6 realizados en presencia del catalizador ácido (11-15%).

El rendimiento de los tres azúcares principales: glucosa, xilosa y arabinosa en la fracción líquida, sólida y como porcentaje de pérdidas, se presenta en la Figura 4-9 A, B y C. El rendimiento se calculó, teniendo en cuenta los gramos de azúcar presentes en cada fracción respecto a la masa potencial de cada azúcar en la materia prima, como se describe en la Ecuación 4-5.

$$\% \text{ Rendimiento} = \left(\frac{g \text{ de azúcar en la fracción líquida o sólida}}{g \text{ de azúcar potencial en la materia prima}} \right) \times 100\% \quad (4-5)$$

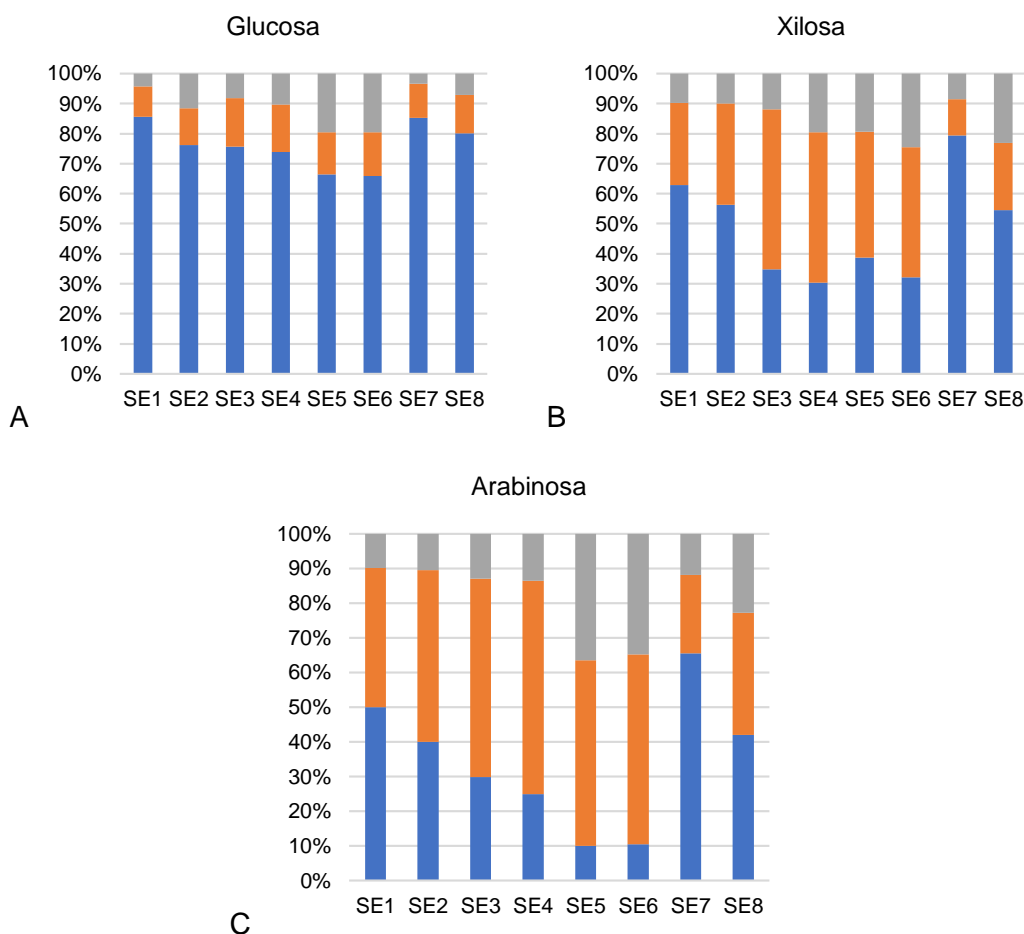


Figura 4-9. Rendimiento de los azúcares: glucosa (A), xilosa (B) y arabinosa (C) en el sólido (barras azules), líquido (barras naranjas) y pérdidas (barras grises) para los ocho ensayos de SE sobre la cascarilla de cebada desproteinizada

En la Figura 4-9 se observa de manera general, que la mejor temperatura para extraer la mayor proporción de los azúcares principales para los ensayos evaluados en los cuales se

realizó impregnación de la cascarilla con ácido, fue la temperatura intermedia de 170°C de las tres evaluadas en el diseño experimental, le siguieron en mayor grado de extracción los ensayos sometidos a 180°C y por último las pruebas a 160°C.

En cuanto al factor del tiempo se observó que el más largo (30 min) permitió una mayor recuperación de los azúcares, aunque este fue más significativo para las temperaturas de 160 y 170°C, quiere decir esto, que para la temperatura de 180°C el tiempo no tuvo una diferencia marcada en la recuperación de los azúcares, gracias a que a temperaturas y a tiempos más largos de pre-tratamiento los azúcares podrían degradarse en mayor medida en comparación con temperaturas inferiores y tiempos más cortos. Lo que adicionalmente se corrobora con el porcentaje de pérdidas de azúcares que se obtienen para la temperatura de 180°C en comparación con la de 160 y 170°C. Aunque, estadísticamente la temperatura fue el único factor que tuvo significancia sobre el rendimiento de solubilización tanto de la glucosa como de la xilosa en el líquido ($p < 0,05$), no se encontró ninguna incidencia significativa de los factores evaluados en cuanto al rendimiento de la arabinosa y de manera general el tiempo no tuvo ninguna incidencia estadística en la recuperación de ninguno de los tres azúcares (Anexo I).

Adicionalmente, cabe destacar, que para estos seis ensayos el incremento en los grupos acetilo después de la etapa de desproteización y eliminación de almidón (casi al doble de la cascarilla original), sumado a la impregnación del material con ácido, lograron generar una mayor reacción de auto-hidrólisis en el SE, lo que a su vez se ve reflejado en los porcentajes más altos de rendimiento alcanzados para la xilosa y arabinosa.

Si se realiza un análisis del rendimiento de cada azúcar principal, se encuentra que por ejemplo, para la glucosa (Figura 4-9 A), se logra una solubilización de máximo el 16% para el ensayo SE4 (170°C por 30 min), quiere decir esto que la celulosa, principal fuente de glucosa en esta cascarilla sometida al SE después de la etapa de desproteización y eliminación de almidón, debe concentrarse en mayor proporción en los sólidos, tanto en el caso del material impregnado con ácido como el que no se impregnó, a su vez, el mayor porcentaje de rendimiento de este azúcar en los sólidos se encontró a las temperaturas y tiempos más bajos de reacción, los ensayos del material sin impregnación con ácido dieron resultados muy parecidos a las condiciones evaluadas a 160°C con el material impregnado. En cuanto al porcentaje de pérdidas de la glucosa se encuentra que la condición que más

afecta la recuperación de este azúcar, corresponde a la temperatura de 180°C tanto a los 15 como a los 30 minutos de tiempo de residencia.

Por lo tanto, podría concluirse que de los seis ensayos evaluados, el que arrojó mejores resultados en cuanto a la extracción de hemicelulosa (xilosa y arabinosa) en el líquido fue el ensayo denominado SE4 (170°C por 30 min) con un 49,8% de rendimiento para la xilosa y un 61,5% para la arabinosa (Figura 4-9 B y C), seguido muy de cerca de los resultados encontrados para los ensayos SE3, SE5 y SE6 que comprendieron rendimientos entre el 41,6-44,6% para la xilosa y 53,5-57,3% para la arabinosa, el porcentaje a su vez decayó a valores inferiores al 33% en cuanto a la xilosa y 49,5% para la arabinosa en los ensayos a 160°C y para el material sin impregnación, aunque cabe destacar que para lograr la recuperación de estos azúcares se hace evidente de nuevo la adición del catalizador ácido previamente al pre-tratamiento, para así lograr una mayor solubilización en el líquido.

En cuanto al tiempo de residencia, puede decirse que a los 30 minutos se obtiene un porcentaje ligeramente superior de rendimiento de xilosa y arabinosa en el líquido en comparación con el tiempo de 15 minutos, aunque la diferencia no es muy significativa y esta se acorta a medida que se incrementa la temperatura de los ensayos, lo cual se ratifica con el análisis de varianza realizado sobre estas variables de respuesta, donde se encontró, que el factor tiempo no tiene ninguna incidencia significativa sobre los rendimientos de los azúcares ni en la fracción líquida ni en la fracción sólida (Anexo I). Lo anterior es una ventaja porque podrían escogerse tiempos cortos que disminuyen el gasto energético y la menor formación de compuestos de degradación de los azúcares, que posteriormente podrían tener carácter inhibitorio en la fermentación.

La mayor concentración de xilosa y arabinosa en los sólidos se encontró para el material sometido a la temperatura de 160°C impregnada con ácido y para el material sometido al SE sin impregnación. El porcentaje de pérdidas de estos azúcares estuvieron alrededor del 10 a máximo 36%, obteniéndose el mayor porcentaje para los ensayos a la temperatura más alta cuando el material estaba previamente impregnado con ácido, quiere decir esto, que tanto la xilosa como la arabinosa en comparación con la glucosa tiende a degradarse en mayor proporción a estas condiciones evaluadas.

De manera general para los dos ensayos de explosión con vapor sin previa impregnación del material con ácido (SE7 y SE8), se evidenció que la mejor temperatura para extraer una mayor proporción de azúcares, correspondió a los 180°C, con este resultado también se

corroborar que la impregnación del material con el ácido es necesaria en esta etapa para lograr rendimientos de extracción mayores a, por ejemplo, el 22% de xilosa máxima obtenida en los dos ensayos sin impregnación con ácido.

En la Tabla 4-13 se presenta la caracterización de los WIS o sólidos pre-tratados después de la separación del *slurry*. La fracción de celulosa y lignina ácido insoluble de manera general tiende a concentrarse en el material, la celulosa se concentra aproximadamente un 6% después del pre-tratamiento, encontrándose valores ligeramente superiores para el material pre-tratado a la temperatura de 170°C, cabe destacar que para los dos ensayos realizados sin impregnación con ácido, la celulosa se concentra aproximadamente igual que para los ensayos realizados a las temperaturas de 160 y 180°C. Estadísticamente, ninguno de los factores evaluados tuvo una incidencia significativa en la fracción de la celulosa en los WIS (Anexo I).

La lignina ácido insoluble es la fracción de la cascarilla de cebada desproteinizada que más se concentra en los WIS, por ejemplo, entre un 20 a un 31% de la composición en base seca. Para las temperaturas de 170 y 180°C se evidencia el mayor porcentaje de concentración, alcanzando valores incluso de hasta un 41%. Para la temperatura de 160°C se concentra hasta un ~30%, valor equivalente para los sólidos obtenidos en los dos ensayos sin impregnación con ácido. En la Tabla 4-13 se presenta en dos formas la lignina ácido insoluble: antes y después de la corrección por proteínas, ya que por ejemplo en el presente estudio ~2/3 de la proteína en la técnica de determinación de lignina se deposita conjunto con la lignina. Teniendo en cuenta la discusión de Rommi (et al., 2018), quienes encontraron que hasta el 29% de la lignina Klason corresponde a proteína y cenizas para la cascarilla de cebada sin pre-tratamiento y se incrementa hasta el 40% para la cascarilla de cebada pre-tratada por el SE (aunque esta no se había sometido a etapas de desproteinización previamente al tratamiento).

Los resultados que ellos reportan son consistentes con la literatura previa, por ejemplo, para biomásas de alimentos, tales como los granos de trigo, donde se ha reportado una sobreestimación de la lignina ácido insoluble debido a la presencia de material ácido-insoluble no lignificado, el cual incluye ceras, proteínas y cenizas. Una mayor presencia de proteína y cenizas explica parcialmente el incremento sustancial de la lignina ácido-insoluble de los WIS caracterizados después del SE. En adición a estos componentes, es

posible que los productos de reacción de la lignina y los azúcares liberados durante el SE se incorporen también en la fracción de la lignina Klason, formando complejos insolubles denominados pseudoligninas (Kemppainen et al., 2016).

En cuanto a la fracción de la hemicelulosa, se observa que esta no se concentra como sucede con las otras dos fracciones previamente analizadas, principalmente porque se logró extraer entre el 31-57% de esta en el líquido y adicionalmente un porcentaje significativo de estos azúcares se perdieron (Figura 4-9, B y C). Por tanto, los WIS presentan aun en su estructura una porción de hemicelulosa, mayor para el material que no se había impregnado con ácido (~24%), seguido del material impregnado, donde se alcanzaron porcentajes que variaron entre 12-16%, la mayor cantidad de xilosa expresada como xilano, se encuentra en el material que se sometió a la menor temperatura evaluada (160°C), mientras que para 170 y 180°C la xilosa remanente en el sólido es inferior y muy similar entre estas dos temperaturas (8-11%).

De los grupos acetilo se encontró respecto a la materia prima inicial, que estos permanecen casi constantes para el ensayo realizado a 160°C y para los dos ensayos realizados sin impregnación con ácido, lo que puede demostrar porque la auto-hidrólisis lograda para estas dos condiciones de reacción no fue lo suficientemente alta para liberar una mayor proporción de azúcares hemicelulósicos en el líquido. Mientras que para los ensayos realizados a 170 y 180°C el porcentaje de estos grupos acetilo disminuye casi a la mitad de su valor. Las cenizas totales se concentran ligeramente en los WIS entre valores que variaron de 2,7 a 3,2%.

Finalmente se analizó la composición de los WIS en cuanto a su contenido de proteína después del pre-tratamiento, esta fracción se concentró ligeramente hasta un ~4% más que el valor de la cascarilla de cebada desproteinizada inicial, estos porcentajes fueron mayores para las temperaturas de 170 y 180°C, y disminuyeron levemente para la temperatura de 160°C, mientras que, para los ensayos realizados sin impregnación con ácido, permanecieron casi constantes.

En el trabajo realizado por Kemppainen et al., (2016), el contenido de las proteínas permaneció relativamente estable durante los tratamientos del SE, ellos realizaron un análisis de SDS-PAGE y encontraron que las proteínas se degradaron parcialmente en péptidos, especialmente a altas temperaturas, pero permanecieron insolubles o al menos fuertemente asociadas con otros componentes insolubles. Es posible que la solubilización

de estos péptidos no se haya favorecido por la reticulación y agregación de las proteínas inducidas por el calor o la unión a la lignina. Se sabe que los polifenoles que compone a la lignina interactúan con las proteínas, y, por ejemplo, en los tratamientos de SE sobre paja de trigo la lignina aumenta aún más su capacidad de precipitar con las proteínas por estas interacciones (Zahedifar, Castro, & Ørskov, 2002).

Después de realizar el análisis estadístico de las principales fracciones que se caracterizaron en los WIS, se encontró que el factor temperatura fue significativo solamente para dos variables de respuesta: porcentaje de lignina ácido-insoluble y grupos acetilo, mientras que el factor tiempo no tuvo incidencia significativa en ninguna fracción (Anexo I).

Tabla 4-13. Caracterización WIS después del pre-tratamiento de explosión con vapor

		Cascarilla de cebada impregnada con ácido						Cascarilla de cebada sin impregnación	
Nomenclatura		SE1	SE2	SE3	SE4	SE5	SE6	SE7	SE8
Condi- ciones	T (°C)	160	160	170	170	180	180	170	180
	t (min)	15	30	15	30	15	30	30	30
	H ₂ SO ₄ (%)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	NO	NO
Componentes (materia seca, %)	Celulosa	23,6 ± 1,5	25,6 ± 0,7	26,5 ± 0,4	27,1 ± 0,8	24,4 ± 0,6	25,1 ± 0,4	23,2 ± 0,8	25,5 ± 1,2
	Hemicelulosa	16,9 ± 1,9	18,9 ± 0,1	13,5 ± 0,2	12,3 ± 0,3	13,3 ± 0,2	11,7 ± 0,3	24,7 ± 0,5	23,4 ± 0,6
	Xilano	12,0 ± 1,8	14,6 ± 0,08	9,4 ± 0,2	8,6 ± 0,3	11,0 ± 0,2	9,4 ± 0,2	18,9 ± 0,3	18,3 ± 0,4
	Galactano	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,7 ± 0,08	0,6 ± 0,04	0,8 ± 0,05	0,6 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Arabinano+Manano	4,9 ± 0,1	4,3 ± 0,06	3,4 ± 0,09	3,1 ± 0,07	1,2 ± 0,08	1,3 ± 0,06	5,7 ± 0,2	5,2 ± 0,2
	Lignina Ácido Insoluble (valor en paréntesis)*	32,3 ± 0,6 (29,8)	32,0 ± 0,2 (29,9)	38,4 ± 0,3 (35,0)	41,1 ± 0,4 (37,4)	38,3 ± 2,9 (34,8)	40,6 ± 0,2 (37,0)	29,3 ± 0,3 (27,4)	29,1 ± 0,1 (27,5)
	Grupos acetilo	1,01 ± 0,02	1,01 ± 0,03	0,6 ± 0,01	0,5 ± 0,01	0,6 ± 0,04	0,6 ± 0,03	1,0 ± 0,03	1,0 ± 0,01
	Proteína total	11,1 ± 0,5	9,2 ± 0,3	12,7 ± 0,3	12,8 ± 0,3	12,9 ± 0,3	12,6 ± 0,1	9,4 ± 0,3	8,1 ± 0,9
	Cenizas totales	3,1 ± 0,06	2,7 ± 0,1	3,2 ± 0,06	3,2 ± 0,07	2,9 ± 0,02	3,1 ± 0,04	2,9 ± 0,03	2,8 ± 0,01
	Total	88,0	89,3	94,8	97,0	92,4	93,6	90,6	89,9

*Lignina ácido insoluble, corregida por proteína

La caracterización del líquido de pre-tratamiento en cuanto a la concentración de los compuestos denominados inhibidores de fermentación, se presenta en la Tabla 4-14, estos se dividieron en tres grupos principales: (1) ácidos alifáticos, donde se determinó el ácido acético, fórmico y levulínico, (2) derivados del furano, donde se cuantificó el furfural y el 5-hidroximetil furfural (HMF) y (3) compuestos fenólicos, conformados por el ácido furoico, vainillina, siringaldehído, ácido cumárico y ferúlico. De todos los inhibidores que se pudieron cuantificar los que se presentaron en mayor concentración fueron el ácido acético y el furfural, su concentración varió entre 0,1-0,4 g/L para el primero y entre 0,1-0,9 g/L para el segundo. La mayor concentración de ácido acético y furfural se obtuvo para el ensayo SE8 (180°C por 30min) con un valor de 0,393 y de 0,972 g/L, respectivamente.

El ácido acético se produjo en mayor concentración a las temperaturas de 170 y 180°C comparado con la de 160°C en ensayos en los cuales la biomasa se impregnó con ácido, aunque cuando la cascarilla no estaba impregnada también se produjo ácido acético, inclusive un tanto mayor que el obtenido para el ensayo SE1 y SE2 (impregnado con ácido a 160°C), en cuanto al tiempo de residencia puede decirse que a mayor tiempo se genera ligeramente una mayor concentración de estos compuestos. Para el caso del furfural el comportamiento es semejante al ácido acético en cuanto al factor de la temperatura en el material impregnado con ácido, pero diferente para el material que no se impregnó (SE7 y SE8), ya que en estos dos últimos ensayos se obtiene en muy pequeña concentración (0,015g/L), debido a la no degradación de los compuestos mediados por la falta de acidez en el medio.

La combinación de las concentraciones obtenidas para todos los inhibidores fue de 0,35 g/L para los ensayos a 160°C con impregnación, valor semejante al encontrado para los dos ensayos sin impregnación con ácido (0,40g/L). Mientras que, para la temperatura de 170 y 180°C se encontraron valores superiores a 1 g/L hasta un máximo de 1,55 g/L, incrementándose ligeramente con el tiempo de pre-tratamiento. Kemppainen et al., (2016) no reportan valores superiores a 1 g/L en sus siete ensayos, aunque cabe destacar que el máximo tiempo de residencia que ellos evaluaron correspondió a 10 min y ellos solamente impregnaron un ensayo con ácido.

Tabla 4-14. Concentración de los compuestos inhibidores de fermentación

Nomenclatura del ensayo		Concentración compuestos tóxicos o inhibidores de la fermentación (g/L)					
		Ácidos alifáticos			Derivados del furano		
		Fórmico	Acético	Levulínico	HMF	Furfural	
Impregnación con ácido	SE1	0,033	0,118	0	0,016	0,177	
	SE2	0,027	0,127	0	0,016	0,175	
	SE3	0,095	0,164	0,038	0,071	0,911	
	SE4	0,065	0,331	0	0,077	0,960	
	SE5	0,066	0,300	0	0,072	0,644	
	SE6	0,085	0,393	0	0,088	0,972	
Sin impregnación	SE7	0,060	0,275	0	0	0,015	
	SE8	0,076	0,257	0	0,001	0,060	
Nomenclatura del ensayo		Concentración compuestos tóxicos o inhibidores de la fermentación (g/L)					
		Compuestos fenólicos					
		Ac. Furoico	Vainillina	Siringaldehido	Ac. Cumárico	Ac. Ferúlico	Suma fenólicos
Impregnación con ácido	SE1	0,002	0,003	n.d.	n.d.	n.d.	0,005
	SE2	0,002	0,003	0,001	n.d.	n.d.	0,006
	SE3	0,018	0,008	0,002	0,002	0,02	0,050
	SE4	0,008	0,006	0,001	n.d.	n.d.	0,015
	SE5	n.d.	0,008	0,001	0,001	0,009	0,019
	SE6	n.d.	0,009	0,001	0,001	n.d.	0,011
Sin impregnación	SE7	0,003	0,013	n.d.	0,012	0,021	0,049
	SE8	0,003	0,012	n.d.	0,013	0,02	0,048

Comparado con otras biomásas para la cascarilla de cebada desproteinizada y sometida al SE, se obtuvo una menor concentración de inhibidores respecto a 6,11 g/L que se reporta para la paja de trigo pre-tratada a 200°C x 4 min (Álvarez et al., 2017) y 29,4 g/L para la misma biomasa pero a condiciones de 220°C x 2,5 min (Moreno, Ibarra, Ballesteros, González, & Ballesteros, 2013).

En la Figura 4-10 se observa la distribución de los inhibidores de fermentación de los diferentes ensayos definitivos, allí se observa que el mayor porcentaje correspondió a los derivados del furano con un porcentaje de 55-74% siendo superior para la temperatura de 170°C, sobre la de 160 y 180°C, aunque se produjo más furfural y 5-HMF para la temperatura de 180°C sobre la de 160°C, a su vez de estos dos compuestos el que se produjo en mayor proporción fue el furfural respecto al 5-HMF indicando que los azúcares más susceptibles de degradarse fueron la xilosa y/o arabinosa.

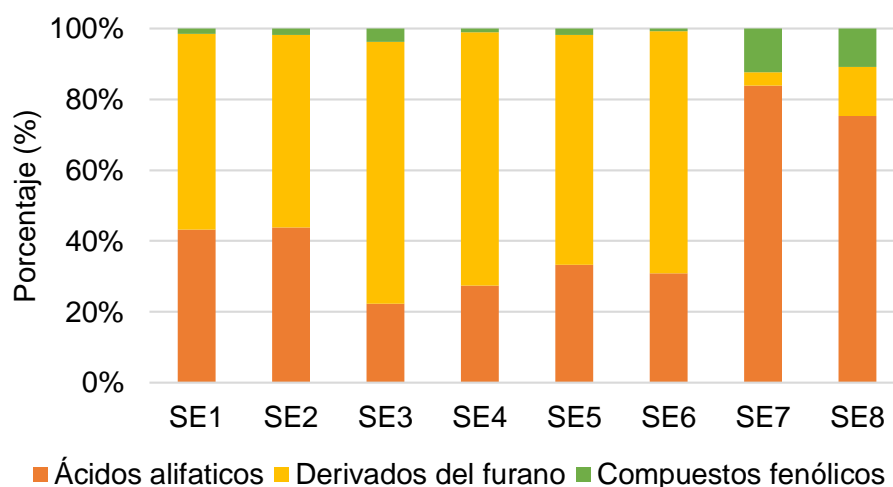


Figura 4-10. Distribución de los inhibidores de fermentación para los diferentes ensayos SE1-SE8

La fracción de los ácidos alifáticos fue la fracción de inhibidores que se generó en segunda mayor proporción, con valores entre 22-44%, obteniéndose más ácido acético a la temperatura de 180°C, seguido de 170 y 160°C. En cuantos a los compuestos fenólicos se encontró que estos se liberaron solo de un 0,7 a 3,8% como vainillina, ácido ferúlico y cumárico principalmente. En cuanto a los ensayos sin impregnación con ácido se evidencio que se favorece más la liberación de ácidos alifáticos (75-84%) en comparación con los derivados del furano y los compuestos fenólicos. Lo cual ratifica que la presencia de ácido

en el SE favorece no solamente la solubilización de los azúcares sino en menor medida su degradación.

4.3.6 Punto óptimo a las condiciones evaluadas

Con los rangos de las variables evaluadas en el diseño experimental del pre-tratamiento de explosión con vapor (ensayos definitivos SE1 a SE6) se realizó un análisis de superficie de respuesta de optimización múltiple, maximizando la recuperación de xilosa en la fracción líquida (% de rendimiento) y la concentración de xilosa en el líquido (g/L). Ya que es importante para las etapas posteriores del proceso (hidrólisis y fermentación) recuperar no solamente la mayor cantidad de xilosa en el líquido, sino también que esta se encuentre lo más concentrada posible, de esta forma se evitaría posteriormente un mayor consumo energético para las operaciones de concentración antes de la HE, ya que la xilosa, materia prima para la etapa de fermentación hasta xilitol, debe ajustarse a un valor de ~80g/L como mínimo (Mussatto & Roberto, 2008).

El valor óptimo estadísticamente se encontró a los 173,5°C y 15,5 minutos de pre-tratamiento, como se observa en la Figura 4-11. Este punto correspondió estadísticamente a una deseabilidad de 0,92, donde la superficie de respuesta estimó teóricamente una recuperación de xilosa en el líquido de 46,35% y una concentración de 14,7 g/L.

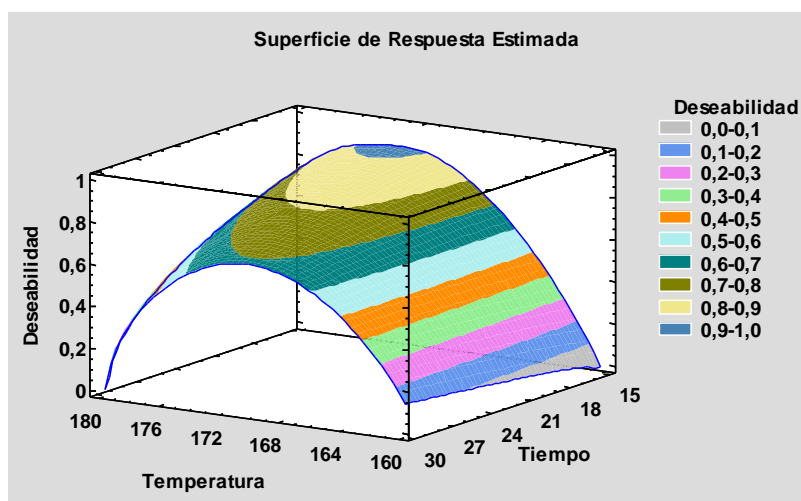


Figura 4-11. Superficie de respuesta estimada maximizando el rendimiento y concentración de xilosa en el líquido de pre-tratamiento de SE.

Los resultados de este ensayo arrojaron un rendimiento en el líquido de 16,4% para la glucosa, 47,0% para la xilosa y 63,3% para la arabinosa, mientras que en el sólido se

encontró un rendimiento del 77% para la glucosa, 35,2% para la xilosa y 10,4% para la arabinosa. Validándose entonces, los resultados predichos por el modelo estadístico.

En la Tabla 4-15 se muestra la caracterización del líquido pre-tratado para las cinco repeticiones del punto óptimo en cuanto a los azúcares neutros libres y totales que se extrajeron en esta fracción. El porcentaje de azúcares neutros libres demostró de nuevo que la arabinosa es el azúcar que mayor se libera como azúcar libre en el líquido con un 93% y que solo el 30% de la xilosa se libera como azúcar neutro a partir del polisacárido extraído por el SE. El porcentaje de azúcares totales potenciales indicó que un 70% de la xilosa extraída en el líquido es viable de hidrolizarse y que solo un 7% de la arabinosa se encuentra aún unida a la cadena principal de la hemicelulosa de la cascarilla de cebada.

Tabla 4-15. Caracterización del líquido de pre-tratamiento del SE en el punto óptimo, en cuanto a los azúcares neutros libres y potenciales de hidrólisis

Azúcar	Concentración de azúcares (g/L)		Porcentaje de azúcares (%)	
	Libres	Totales	Libres	Potenciales para hidrólisis
Glucosa	2,47 ± 0,01	6,24 ± 0,38	39,73 ± 2,54	60,27 ± 2,54
Xilosa	4,65 ± 0,12	14,80 ± 1,26	29,17 ± 1,67	70,83 ± 1,67
Galactosa	0,50 ± 0,00	0,93 ± 0,10	49,54 ± 3,36	58,08 ± 3,36
Arabinosa	6,83 ± 0,69	6,99 ± 0,48	92,91 ± 3,99	7,09 ± 3,99

La recuperación de los WIS correspondió al 60% y los WSS al 32%, para un total de sólidos del 91,5%. Después de la caracterización de los WIS, se obtuvo la composición en base seca que se presenta en la Tabla 4-16. La celulosa (26,4%) y la lignina ácido insoluble (37%), fueron las fracciones que se concentraron en mayor proporción. La hemicelulosa remanente en el sólido correspondió a 13,5%, donde se encontró aún un potencial de xilano del 12,5%. Las cenizas totales permanecieron constantes respecto a la materia prima original y la fracción de la proteína se concentró hasta un 12,7%.

Tabla 4-16. Composición promedio de los WIS obtenidos en el punto óptimo 173,5°C, 15,5 min y 0,5% p/v H₂SO₄)

Componente	Materia seca (%)
Celulosa	26,4 ± 1,2
Hemicelulosa	13,5 ± 0,3
Xilano	12,5 ± 0,8
Galactano	0,0 ± 0,0
Arabinano+Manano	1,5 ± 0,6
Lignina Ácido Insoluble	37,0 ± 1,4
Grupos acetilo	0,5 ± 0,1
Proteínas	12,7 ± 0,3
Cenizas	2,4 ± 0,1
Total	92,5

El líquido presentó un total de 0,757g de compuestos inhibidores totales/L. De este total se encontró que la mayor concentración correspondió al ácido acético (0,181 g/L) y al furfural (0,452 g/L). El HMF y los compuestos fenólicos se presentaron en menor medida (Tabla 4-17).

Tabla 4-17. Caracterización compuestos inhibidores en el líquido de pre-tratamiento, para el punto óptimo (173,5°C, 15,5 min y 0,5% p/v H₂SO₄)

Componente	Concentración (g/L)
Ac. Acético	0,181 ± 0,02
Furfural	0,452 ± 0,10
HMF	0,057 ± 0,01
Vainillina	0,009 ± 0,001
Siringaldehído	0,001 ± 0,000
Ac. Cumárico	0,0066 ± 0,002
Ac. Ferúlico	0,0174 ± 0,004
Suma fenólicos	0,033 ± 0,006

4.3.7 Hidrólisis enzimática

En la Tabla 4-18 se presenta la caracterización de los dos líquidos que se evaluaron como sustratos en el primer ensayo de la HE: (1) líquido crudo y (2) líquido 5,5 veces concentrado, en cuanto a la concentración y porcentaje de azúcares libres y azúcares potenciales de hidrólisis.

Tabla 4-18. Caracterización del líquido crudo y concentrado 5,5 veces para la HE

		Líquido crudo			Líquido 5,5 veces concentrado		
		Glucosa	Xilosa	Arabinosa	Glucosa	Xilosa	Arabinosa
Concentración (g/L)	Azúcares libres	1,682	4,105	5,584	8,815	24,361	32,812
	Azúcares totales	5,918	14,715	6,727	23,508	73,742	39,05
Porcentaje (%)	Azúcares libres	28,4	27,9	83,0	37,5	33,0	84,0
	Azúcares potenciales de hidrólisis	71,6	72,1	17,0	62,5	67,0	16,0

Kemppainen et al., (2016) reportan que la fracción líquida resultante del pre-tratamiento con SE está compuesta principalmente de oligo y polisacáridos solubles, monosacáridos y proteína solubilizada. Por ejemplo, algo de la hemicelulosa solubilizada que ellos reportan se encuentra como pequeños oligosacáridos lineales que contienen 2-10 unidades de xilosa. Además, los análisis de los líquidos mostraron que 5-9% de la proteína soluble estaba en la forma de grupos nitrogenados libres, incluyendo aminoácidos y grupos amino de péptidos libres. Álvarez et al., (2017) a su vez reportaron para el líquido obtenido del pre-tratamiento del SE (200°C por 4 min) sobre paja de trigo la presencia de xilo-oligómeros de DP2 a DP13 usando técnicas de HPAEC-PAD.

La concentración máxima que se obtuvo de xilosa en el líquido 5,5 veces concentrado correspondió a un valor de 73,74 g/L, valor inferior a los 80 g/L teóricos que se debían alcanzar en la etapa de evaporación debido posiblemente a una subestimación de la xilosa total. La técnica analítica empleada consistió en una hidrólisis ácida de los oligo y polisacáridos extraídos en el líquido y debido a la presencia de compuestos nitrogenados solubles, era inevitable obtener productos de degradación por posibles reacciones de Maillard, por ejemplo, (Sørensen, Pedersen, Jørgensen, et al., 2007) aluden el mismo inconveniente en la determinación de la arabinosa total de AX de trigo por la degradación parcial de los monosacáridos durante la hidrólisis ácida.

El líquido crudo, tiene aproximadamente 70% de xilosa y glucosa potenciales de hidrólisis, extraída principalmente como fracciones de oligómeros de diferente peso molecular. En cuanto a la arabinosa, el potencial de hidrólisis es tan solo del 17%, ya que el 83% de este azúcar después del pre-tratamiento por SE se libera como azúcar neutro libre.

Los porcentajes de azúcares libres y el porcentaje de azúcares potenciales en el líquido 5,5 veces concentrado no cambiaron drásticamente luego de la etapa de evaporación al vacío, la concentración final de glucosa, xilosa y arabinosa que se obtuvo fue de 23,5, 73,7 y 39,1 g/L respectivamente.

▪ Ensayo con enzimas comerciales puras

En la Figura 4-12 se observa el rendimiento de azúcares liberados: xilosa y arabinosa en función del tiempo para la primera hidrólisis sobre el líquido crudo, en esta se evidencia que con la combinación y cantidad de enzimas adicionadas (Tabla 4-3) se alcanzó a hidrolizar 54,7% de la xilosa a las 24 horas de reacción, sin incrementarse en mayor proporción la xilosa liberada a las 48 horas de reacción (56,6%), para la arabinosa se evidencia un rendimiento ligeramente mayor de alrededor del 70-76% a las 24 y 48 h, respectivamente.

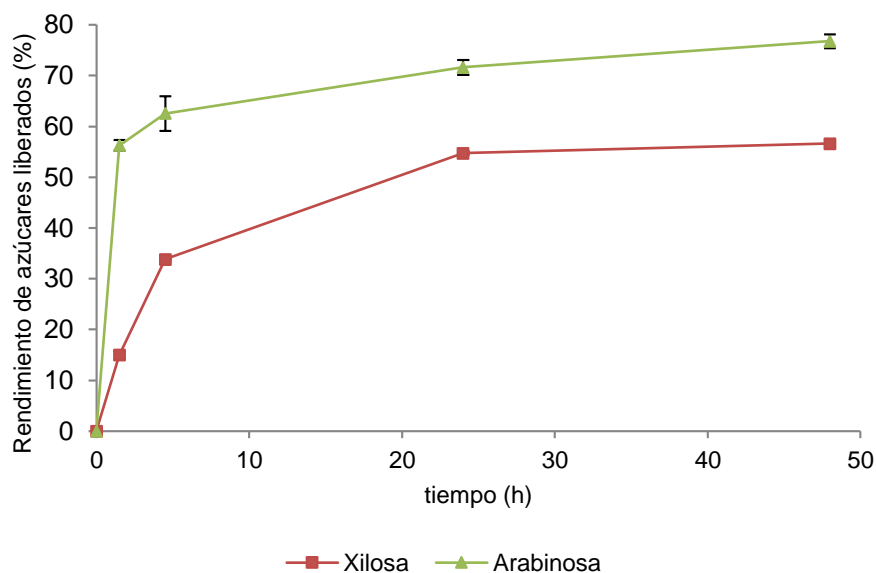


Figura 4-12. Rendimientos de azúcares liberados: xilosa y arabinosa después de la HE con el líquido crudo proveniente del SE en el punto óptimo

El mayor rendimiento de arabinosa liberada en comparación con la xilosa podría deberse a la falta de una mayor cantidad de β -xilosidasa en la mezcla evaluada, ya que en primera instancia el potencial de xilosa susceptible de hidrolizarse es superior cuatro veces respecto al potencial de arabinosa y aunque se liberen oligosacáridos por acción de las dos endo-1,4- β -xilanasas en sinergia con las α -L-arabinofuranosidasas usadas, la

hidrólisis de estos fragmentos más pequeños hasta xilosa requiere en mayor medida de la acción sinérgica de la actividad específica de la β -xilosidasa en el medio. La diferencia de rendimiento también pudo deberse a la presencia de otros grupos sustituyentes en la cadena principal de AX o en los fragmentos de oligosacáridos diferente a la arabinosa, que ejercieron un impedimento estérico sobre el ataque de las endo-1,4- β -xilanasas y β -xilosidasas sobre el sustrato.

Con el líquido concentrado 5,5 veces se obtuvo un rendimiento de xilosa de aproximadamente 40% hasta las 48 horas, como se observa en la Figura 4-13. Cabe destacar que a las 48 horas de reacción aún no se ha llegado al equilibrio de la curva de progreso para la liberación de la xilosa, como si se observa para este azúcar en la hidrólisis del líquido crudo (Figura 4-12), lo que indica que posiblemente la reacción enzimática para el líquido 5,5 veces concentrado podría tomar más de 48 horas, al tener ~5,5 veces más concentrados los azúcares y una dosis de mezcla enzimática menor para la gran cantidad de sustrato presente. Sin embargo, a pesar del considerable incremento del sustrato en esta reacción, la dosis y combinación de estas enzimas logró hidrolizar parcialmente los oligómeros potenciales del líquido 5,5 veces concentrado.

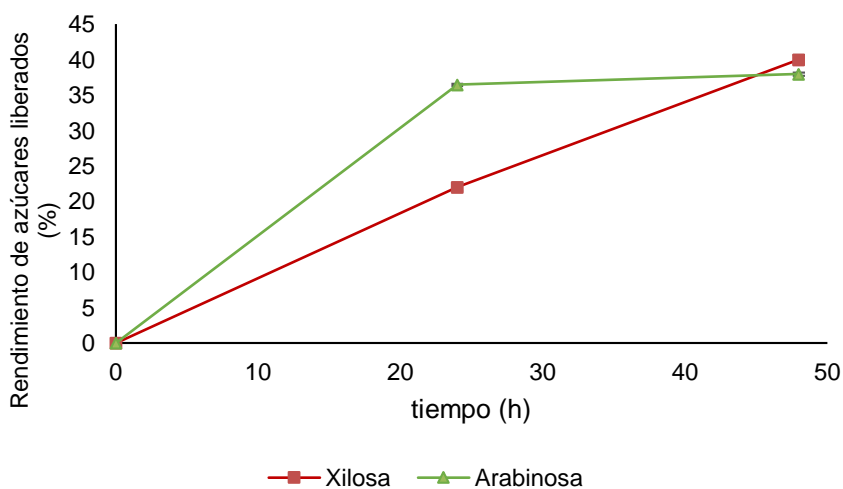


Figura 4-13. Rendimientos de azúcares liberados: xilosa y arabinosa después de la HE en el líquido concentrado 5,5 veces

En cuanto al rendimiento de hidrólisis de arabinosa (Figura 4-12) se encontró un valor de 38% a las 48 h de reacción, alcanzándose casi la mitad del rendimiento obtenido de liberación de arabinosa en el líquido crudo, al mismo tiempo de reacción, debido no

solamente al incremento de este sustrato en el líquido 5,5 veces concentrado, sino también a la disminución de la dosificación de las enzimas (cinco veces inferior, respecto al líquido crudo).

Los resultados obtenidos en este primer ensayo permitieron establecer que es viable hidrolizar el líquido 5,5 veces concentrado hasta xilosa principalmente, al haberse encontrado un rendimiento de 40%, inferior tan solo 16,6% en comparación con el líquido crudo (56,6%), empleando el mismo porcentaje de combinación de enzimas, aunque utilizando una dosis cinco veces inferior. Cabe destacar, de acuerdo con el balance de energía realizado teóricamente a las dos opciones de proceso (1) hidrolizar el líquido obtenido en el pre-tratamiento y después concentrarlo para la fermentación o (2) concentrar el líquido del pre-tratamiento a las condiciones de alimentación de la fermentación e hidrolizarlo posteriormente (datos no mostrados), que se encontró una mejor respuesta desde el punto de vista energético para la segunda opción. Por lo tanto, los ensayos posteriores con las enzimas comerciales puras consistieron en alcanzar un porcentaje de hidrólisis igual o superior en el líquido 5,5 veces concentrado al encontrado en el líquido crudo, para ello se varió las dosis y el porcentaje de combinación de las enzimas, en busca de mejorar estos rendimientos.

En la Figura 4-14 se observa el rendimiento de liberación de xilosa y arabinosa después del ajuste al nuevo porcentaje de combinación y dosis de enzimas solamente sobre el líquido 5,5 veces concentrado, en este se logró un rendimiento de ~60% de xilosa a las 24 horas de reacción, porcentaje que ya es semejante al encontrado en el primer ensayo con el líquido crudo y 20% más que el alcanzado en el ensayo sobre el líquido concentrado con una dosis de enzimas inferior (0,3 mg enzima-proteína/g AX potencial). La muestra a las 24h, según el análisis del cromatograma obtenido por HPLC presentó aún un 3,49 g/L de xilobiosa, aunque liberó 51,23 g/L de xilosa y se redujeron los azúcares en la forma DP4-DP2 hasta el 15,98 % y los DP>DP4 al 20,78%, con lo cual se demuestra que, aunque se mejoró el porcentaje de hidrólisis de la xilosa liberada aún quedaba un 36,76% de xilosa en forma de oligosacáridos por hidrolizar.

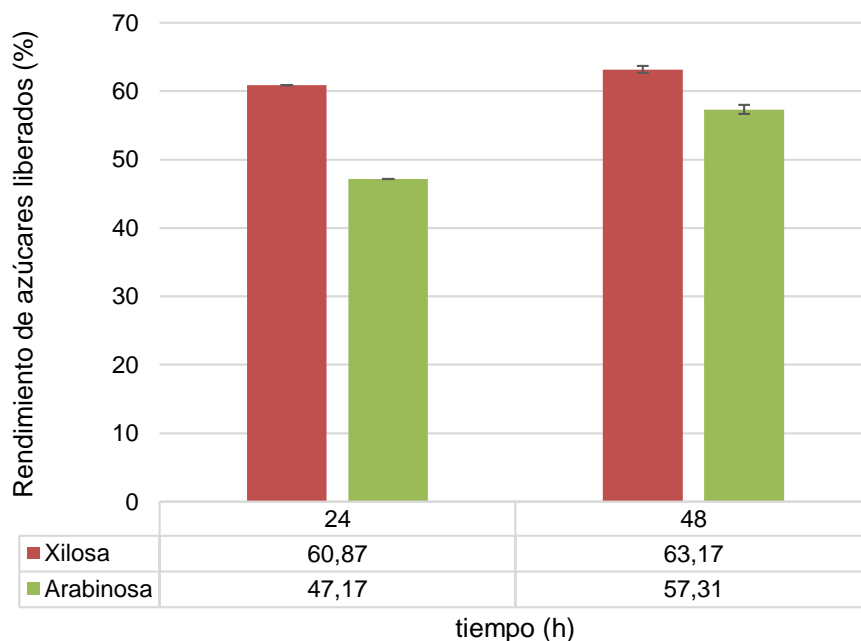


Figura 4-14. Rendimientos de azúcares liberados: xilosa y arabinosa después de la HE, ensayo preliminar con el líquido concentrado 5,5 veces

De otra parte, se obtuvo un rendimiento de arabinosa del 47% a las 24 horas de reacción con esta nueva dosis, incrementándose en 10% la liberación de esta azúcar respecto al ensayo realizado con 0,3 mg de enzimas-proteína/g AX potencial y en la mitad del tiempo. A las 48 horas de reacción se encontró un ligero incremento en la liberación de xilosa, mientras que solo se alcanzó un 10% más de liberación de arabinosa.

La diferencia entre medias por el análisis de Tukey evidenció que de las 24 a las 48 horas de reacción hay diferencias significativas tanto para la liberación de xilosa como de arabinosa.

Por último, se caracterizó el líquido concentrado 5,5 veces tanto a tiempo cero como a tiempo final de la HE en cuanto a su concentración de ácido acético, cumárico y ferúlico, como se presenta en la Tabla 4-19, para validar la posible presencia de grupos acetilo y de enlaces Araf esterificados con el ácido ferúlico y cumárico en la estructura de los AX extraídos por el SE, como lo pronosticaba la teoría (Biely et al., 2016).

La cuantificación del líquido a tiempo inicial y después de 48 horas en la HE reveló el incremento de la concentración de los ácidos acético, cumárico y ferúlico, confirmando así

la presencia de los grupos acetilo y de los enlaces esterificados de la Araf con el ácido ferúlico y cumárico en la estructura de los AX extraídos con el SE. A pesar de estas sustituciones, en este ensayo se encontró liberación de xilosa a pesar de que no se adicionaron enzimas específicas estearasas ya que los sustituyentes ferúlicos de la posición 3- unidos a la Araf no impidieron la acción de las xilanasas, por ejemplo el feruloil arabinoxilobioso (FeA^2Xyl_2 ; FAXX) es el oligosacárido más corto liberado por la xilanasa GH10 (Biely et al., 2016).

Tabla 4-19. Caracterización del líquido 5,5 veces concentrado inicial y final después de la HE, ensayo preliminar en cuanto el contenido de ácido acético, ferúlico y cumárico

Ácido	Concentración (g/L)	
	t=0h	t=48 h
Acético	1,199	1,894
Cumárico	0,026	0,044
Ferúlico	0,074	0,128

El siguiente ensayo contempló la adición de dos nuevas enzimas con actividad específica acetil xilano estearasa y feruloil estearasa, la dosis y el porcentaje de combinación de las enzimas se describió en la sección 4.2.5 de materiales y métodos.

Los resultados obtenidos para el rendimiento de liberación de xilosa se muestran en la Figura 4-15, donde se evaluaron dos tiempos de reacción: 24 y 72 h. Para la primera dosis se observó una diferencia marcada en el rendimiento, respecto al tiempo, a las 24 horas de reacción se alcanzó un 78% de rendimiento, mientras que a las 72 horas el rendimiento se incrementó al 87,2%, en la segunda dosis evaluada no se observó una diferencia estadísticamente significativa de las 24 a las 72 horas, pero cabe destacar que en tan solo 24 horas se alcanzó un rendimiento del 83,9%, superior al encontrado con la primera dosis en el mismo tiempo. Para la tercera dosis tampoco se observaron diferencias significativas entre las 24 y 72 horas, aunque el rendimiento fue ligeramente superior (85,9%) respecto a la primera y segunda dosis. Si se realiza el análisis estadístico de diferencia entre medias para las 24 horas, la dosis tiene un efecto de incremento del rendimiento de xilosa, mientras que a las 72 horas no hay diferencias significativas entre las tres dosis.

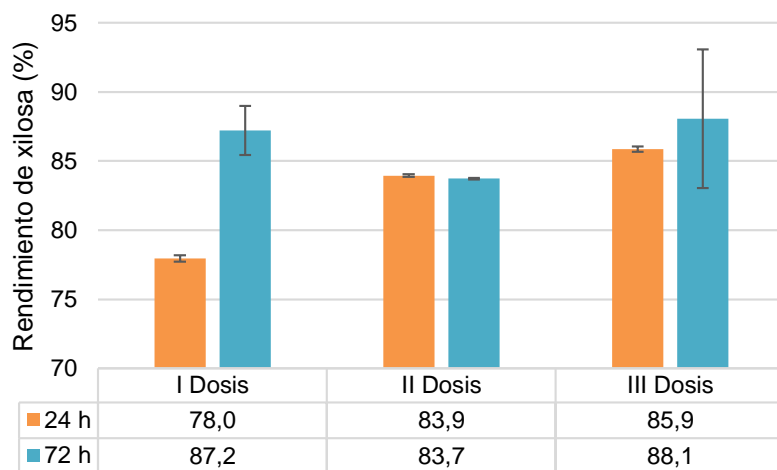


Figura 4-15. Rendimiento de xilosa liberada después de la HE con el líquido 5,5 veces concentrado, teniendo en cuenta la adición de actividades estearasas y tres dosificaciones diferentes

El incremento en el rendimiento de la liberación de xilosa, con la adición de las dos estearasas puede deberse principalmente a las siguientes causas: la acetilación hace que el polisacárido sea más resistente a las xilanasas y algunas estructuras en las cuales la sustitución MeGlcA se combina con la acetilación de los grupos hidroxilo vecinos, por ser aún más recalcitrantes. Por otro lado, la alta solubilidad del xilano acetilado, afecta positivamente su hidrólisis, aunque las xilanasas atacan el polisacárido solamente en aquellas regiones donde no está sustituido o donde puede tolerar el grupo acetilo en la posición 2 o 3. Los últimos aspectos respecto al modo de acción de las xilanasas sobre los polisacáridos acetilados permanecen aún sin ser elucidados. Las xilanasas GH10 pueden tolerar los grupos acetilos sustituidos en la posición +1 y también en -2, pero solo en la posición O-3. En consecuencia, el espectro de los productos generados por las xilanasas GH10 y GH11 de las estructuras acetil glucuronoxilanos de las maderas duras es más compleja que la de los polisacáridos extraídos alcalinamente. Los xilo-oligosacáridos lineales no pueden hidrolizarse a fragmentos más cortos debido a la presencia del grupo acetilo en cualquiera de las tres posiciones de los bloques de residuos Xylp del extremo no reductor, ya que bloquea la acción de la β -xilosidasa (Biely, Mastihubová, la Grange, Van Zyl, & Prior, 2004).

La adición de la α -glucuronidasa GH67 o GH115 a una mezcla de xilanasas y β -xilosidasas solo produciría pequeños cambios en el rendimiento de sacarificación de los

acetilglucuronoxilanos, porque los fragmentos podrían permanecer aun esterificados con el ácido acético. Por otro lado, la acción de la β -xilosidasa sobre los oligosacáridos desglucuronoxilados podría parar al primer residuo de Xylp del extremo no-reductor. Lo único que queda claro, es que la sacarificación enzimática no puede completarse sin la desacetilación de los xilo-oligosacáridos por acción de las acetilxilano estearasas (Biely et al., 2016).

El rendimiento de la liberación de arabinosa, se muestran en la Figura 4-16. Allí se observa que la máxima liberación de arabinosa se alcanzó con la primera y tercera dosis a las 72 horas de reacción. Aunque la liberación de arabinosa no superó el 30%, en comparación con el anterior donde se alcanzó a liberar hasta ~50% de arabinosa a las 48 h de reacción, aunque con una mayor adición de α -L-arabinofuranosidasas y sin la adición de las enzimas estearasas, lo cual indica que a pesar de que los AX extraídos y concentrados en el líquido 5,5 veces concentrado presentan un potencial de hidrólisis de solo el 16% respecto a la arabinosa, la actividad enzimática asociada a la liberación de este azúcar no es tan importante como las actividades estearasas para incrementar la liberación de xilosa, pero si repercuten directamente en la liberación de arabinosa. Estadísticamente la diferencia entre medias, mostró para las dosis I y II diferencias significativas en el tiempo, en el caso de la dosis I la liberación de arabinosa se incrementa, mientras que para la II dosis disminuye de las 24 a las 72 horas. Para la dosis III de las 24 a las 72 horas no hay diferencias significativas. Ahora bien, si se compara el tiempo para las tres dosis, a las 24 horas se observa un ligero incremento con el aumento de la dosis, pero a las 72 horas no se presentan diferencias significativas entre la I y III dosis, pero si hay diferencia entre medias para la I y III dosis versus la II dosis. Podría concluirse entonces para la liberación de arabinosa, que, si la reacción se realiza solamente hasta las 24 horas, es mejor incrementar la dosis, pero si se alarga el tiempo de reacción hasta las 72 horas podría usarse solamente la I dosis.

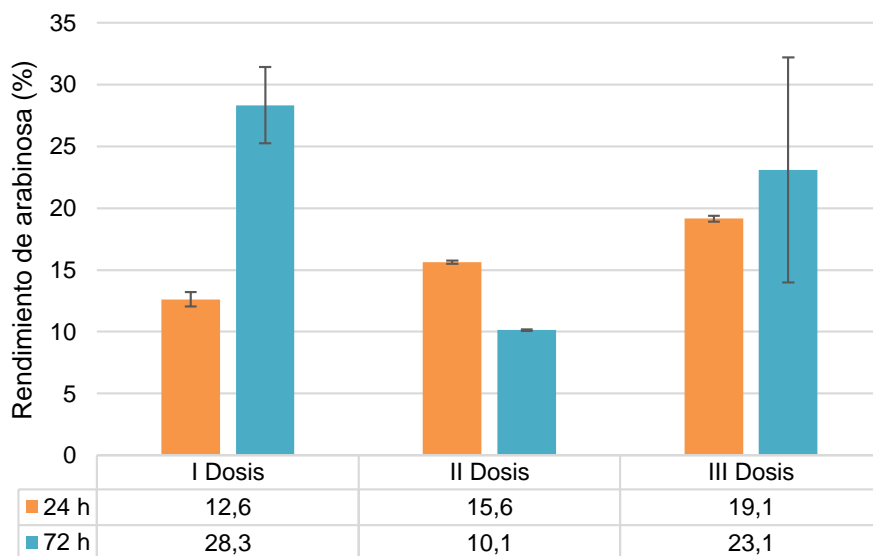


Figura 4-16. Rendimiento de arabinosa liberada después de la HE con el líquido 5,5 veces concentrado, teniendo en cuenta la adición de actividades estearasas y tres dosificaciones diferentes

Con la adición de dos nuevas enzimas tipo estearasas y la eliminación de la α -L-arabinofuranosidasa GH43, el rendimiento total de la arabinosa decayó a un valor inferior al 30% para las tres dosis estudiadas en comparación con el ensayo anterior y se obtuvo solamente un resultado semejante al alcanzado con la dosis previamente evaluada de 0,3 mg proteínas/g AX potencial (primer ensayo de HE sin adición de enzimas estearasas), lo cual muestra que el rompimiento de la Araf como sustituyente en la cadena principal y en los oligómeros extraídos por el SE es uno de los enlaces más complicados de romper en la estructura de estos AX, debido a la presencia de los sustituyentes acetilo y Araf esterificados con el ácido cumárico y ferúlico, como se explicara más adelante.

Agger, (2011) observó que la liberación de arabinosa en sustratos de salvado de maíz fue bajo y no siguieron la *deferuloylation* como se esperaba, cuando la actividad estearasa catalizó la exposición de los AX terminales sustituidos. La poca liberación de la arabinosa corroboró la complejidad del salvado de maíz como sustrato para la hidrólisis enzimática y condujo a las consideraciones de que no toda la arabinosa es originaria de enlaces con sustituciones terminales. Con base en los resultados que estos autores obtuvieron sobre este sustrato en particular, se puede especular que la arabinosa se origina a partir de estructuras de arabinanos o cadenas laterales heterogéneas en relación con las proteínas de la pared celular o las sustancias pécticas, haciendo en ese caso que estos enlaces

fueran inaccesible a las actividades α -L-arabinofuranosidasas empleadas. Particularmente, las cadenas laterales con porciones de arabinosa rodeadas por otros componentes afectaron el grado de liberación de este azúcar.

En el caso de la cascarilla de cebada a pesar de que no se ha reportado una estructura de los AX tan compleja como en el salvado de maíz, si se observa la presencia de enlaces glucosídicos tipo 2-Araf, 3-Araf, 5-Araf y 3,5-Araf (Coelho et al., 2016) confirmado por el ensayo de enlaces glucosídicos presentados en la Tabla 3-12 de la sección 3.3.11 del presente estudio y la presencia del disacárido D-Xylp(β 1-2)-L-Araf(α 1-3) como sustituyente en la posición O-3 de la cadena principal de AX de esta biomasa (Höije et al., 2006; Coelho et al., 2016).

Con este nuevo porcentaje de combinación de enzimas, las cuales tuvieron en cuenta las actividades accesorio estearasas se logró un 20% más de liberación de xilosa respecto al ensayo anterior, alcanzándose rendimientos de hasta ~85%. Por lo tanto, se evidenció que era necesario la adición de estas nuevas actividades enzimáticas a la mezcla de enzimas puras, para obtener un mayor rendimiento de xilosa en tan solo 24 horas de reacción.

Los ácidos hidroxicinámicos (ácido ferúlico y p-cumárico) presente en la cascarilla de cebada tienen un uso potencial en la industria de alimentos, diferentes estudios han incrementado la liberación del ácido ferúlico en presencia de xilanasas, demostrando la acción sinérgica entre estas dos enzimas (Mussatto et al., 2006). Biely et al., (2016) tomaron en cuenta las conclusiones respecto a los resultados de Lagaert, Pollet, Courtin, & Volckaert, (2014) y (Sørensen, Pedersen, Jørgensen, et al., 2007) quienes aseveran que los arabinoglucuronoxilanos desacetilados que no se encuentran fuertemente ramificados con una porción de Araf esterificadas con ácido ferúlico, pueden sacarificarse completamente por la acción de xilanasas de las familias GH10 o GH11 en presencia de las enzimas α -L-arabinofuranosidasas m2,3 y d3 y por supuesto con la adición de β -xilosidasas, α -glucuronidasas y feruloil estearasas, como se demostró en estos ensayos.

De manera general los procesos para la extracción de hemicelulosas de los productos secundarios agrícolas usando explosión con vapor o reactores hidrotérmicos, liberan hemicelulosas con una gran cantidad de enlaces ésteres preservados. Estos se encuentran representados por residuos de Xylp éster acetilados en la cadena principal y residuos de Araf esterificados con el ácido ferúlico. La cantidad de grupos acetilo en los

arabinoglucuronoxilanos no es tan alta como en las estructuras acetilglucuronoxilanos de las maderas duras, pero pueden ser aun relativamente altas, lo que dificulta la despolimerización y sacarificación por parte de las enzimas. Los grupos acetilo aparecen en la misma posición de los residuos de Xylp en la cadena principal como en los glucuronoxilanos de maderas duras (Biely et al., 2016).

La cadena principal tiene residuos 2- y 3-O-monoacetilados, residuos 2,3-di-O-acetilados y también residuos 3-O-acetilados en Xylp los cuales están 2-O-sustituidas con MeGlcA. Un sitio de acetilación distinto que no se produce en el polisacárido de las maderas duras es la posición 2 sobre el residuo de Xylp 3-O-sustituido con Araf, el cual puede estar 5-O-esterificado con el ácido ferúlico. Biely et al., (2016) asevera que hasta el momento no se han llevado a cabo estudios detallados de la degradación de los arabinoglucuronoxilanos acetilados, pero lo que si se tiene claro hasta el momento de los glucuronoxilanos acetilados de maderas duras, es que las acetil xilano estearasas son indispensables para lograr una sacarificación completa. Las enzimas de la familia CE 1, 4, 5 y 6 pueden desacetilar la cadena principal del xilano excepto en el grupo 3-O-acetilado sobre los residuos de Xylp sustituidos con MeGlcA. Como se observa en la Figura 4-17 este grupo es más susceptible de la desacetilación por parte de algunas acetil estearasas CE16 después del rompimiento enzimático de la cadena principal por las xilanasas GH10 o mediante la combinación con las xilanasas GH11 y las β -xilosidasas (Biely et al., 2016).

Las estearasas CE16 son necesarias para liberar los grupos acetilo de la posición 4 del extremo no reductor de los residuos de Xylp donde los grupos acetilo migran. Hasta el momento, no se ha elucidado la degradación enzimática de las regiones altamente sustituidas de los arabinoglucuronoxilanos, pero es innegable que se requiere el ataque secuencial o simultáneo por las GHs y CEs. Debido a impedimentos estéricos por otros sustituyentes en la vecindad del enlace objetivo, algunas de las enzimas pueden exhibir actividades específicas extremadamente bajas en sustratos por lo demás excelentes.

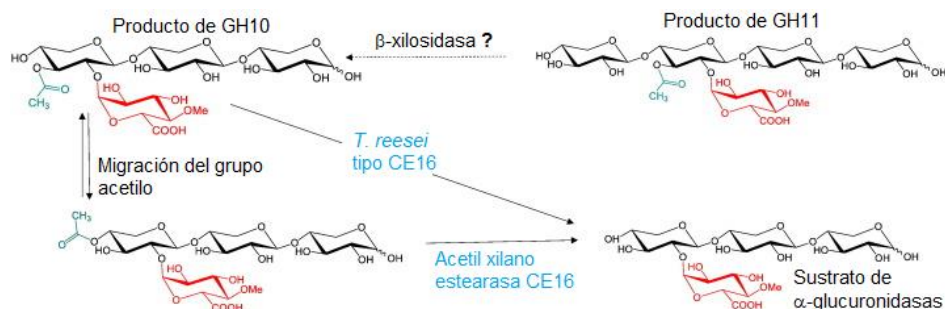


Figura 4-17. Vía de degradación de los ácidos aldourónicos acetilados generados a partir de acetilglucuronoxilanos por las xilanasas GH10 y GH11. El ácido aldotetraurónico 3-O-acetilado ($\text{Ac}^3\text{MeGlcA}^3\text{Xyl}^3$) puede ser desacetilado directamente por algunas desacetilasas CE16, por ejemplo, por la CE16 de *Trichoderma reesei*. Alternativamente, estas pueden ser desesterificadas por las enzimas CE16 en la forma de sus isómeros, formados por la migración del grupo acetilo a la posición 4. Queda por determinar si el ácido aldopentaurónico acetilado formado por las xilanasas GH11 ($\text{Ac}^3\text{MeGlcA}^3\text{Xyl}^3$) sirve como sustrato para la β-xilosidasa (signo de pregunta).

Reproducido de Biotechnology Advances, autores: Peter Biely, Suren Singh, Vladimír Puchart, Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art, Copyright 2018, con licencia de Elsevier [4315171486063]

En este contexto, sería importante averiguar si el grupo 2-O-acetil sobre la Xylp 3-O-sustituida por Araf (Figura 4-18) influirá en la acción de las α-L-arabinofuranosidasas. El bloqueo de la acción de las acetilxilano estearasas con el residuo vecino Araf se pueden anticipar de manera similar como con el MeGlcA en los glucuronoxilanos acetilados (Biely et al., 2016), por esto también no es de extrañar que el rendimiento de liberación de la arabinosa en estos ensayos haya sido tan bajo.

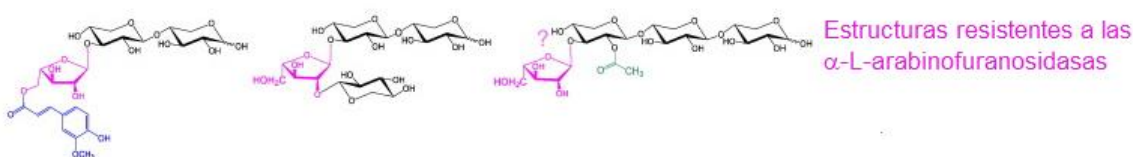


Figura 4-18. Ejemplos de arabinoxilooligosacáridos resistentes a la acción de las α-L-arabinofuranosidasas. Aún no se ha proporcionado evidencia experimental para la resistencia del compuesto con signo de interrogación.

Reproducido de Biotechnology Advances, autores: Peter Biely, Suren Singh, Vladimír Puchart, Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art, Copyright 2018, con licencia de Elsevier [4315171486063]

El estudio de la degradación de los arabinoglucuronoxilanos acetilados fuertemente ramificados utilizando una mezcla de enzimas que consistieron de α -L-arabinofuranosidasa, endo-1,4- β -xilanasa y β -xilosidasas demostró claramente la importancia de la acción de las acetilxilano estearasa y feruloil estearasa para lograr la liberación de xilosa y arabinosa (Agger & Meyer, 2011), así como en el presente estudio.

Por último, en cuanto al análisis de las dosis, se podría descartar el uso de la tercera porque al triplicar la cantidad de esta mezcla enzimática solo se logró aumentar el rendimiento en un 2% a las 24 respecto a la dosis II al mismo tiempo, tanto la primera como segunda dosis podrían emplearse para obtener un buen porcentaje de liberación de xilosa en 24 horas, la segunda dosis presentó un ligero incremento del rendimiento (83,9%) sobre la primera dosis porque logró liberar un 5% más de xilosa en comparación con la primera dosis (78,0%), pero por un criterio económico se escogería entonces la I dosis. Sin embargo, para ratificar la mejor dosis y el tiempo de reacción se realizó un último ensayo realizando la curva de progreso a través del tiempo y la evaluación de dos temperaturas de proceso, como se describe a continuación.

En la Figura 4-19 se observa la curva de progreso de la hidrólisis enzimática a 40°C, allí se evidencia un mayor rendimiento para la segunda dosis después de las 4 horas de reacción. La II dosis alcanza ~89% de rendimiento, mientras que para la I dosis se alcanza solo un 76% a las 24 horas de reacción, tiempo en el cual se alcanza el equilibrio de la reacción. De nuevo como se evidenciaba en los ensayos de HE sobre los AX extraídos por el pre-tratamiento alcalino (Figura 3-22, 3-23 y 3-24), la velocidad inicial de la reacción para estas enzimas es muy rápida, por ejemplo, en la Figura 4-19 se observa que después de las 2 horas de reacción ya se ha perdido la linealidad de la curva y se ha alcanzado entre un 50-60% del rendimiento total de la reacción.

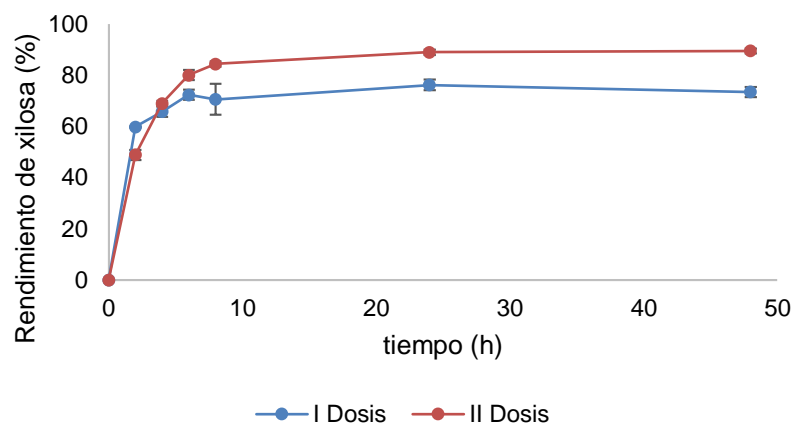


Figura 4-19. Rendimientos de xilosa liberada después de la hidrólisis enzimática con el líquido 5,5 veces concentrado a dos dosis diferentes y 40°C

En cuanto al comportamiento de la hidrólisis a 50°C, se observa en la Figura 4-20 que, al comienzo de la reacción, aproximadamente hasta las 4 h se favorece más la II dosis, después, tanto a las 24 como a las 48 horas se encuentran porcentajes de rendimiento muy cercanos entre sí, inclusive a las 24 horas el rendimiento de la I dosis supera ligeramente el rendimiento obtenido para la II dosis. El rendimiento máximo que se obtiene es del orden del 83,1% a las 24 horas para la I dosis, seguido muy de cerca por un 74,3% para la II dosis, con esto se corrobora que la temperatura (40°C) escogida del balance de los óptimos de las diferentes actividades enzimáticas es la ideal para obtener mayores rendimientos y evitar así un mayor gasto energético.

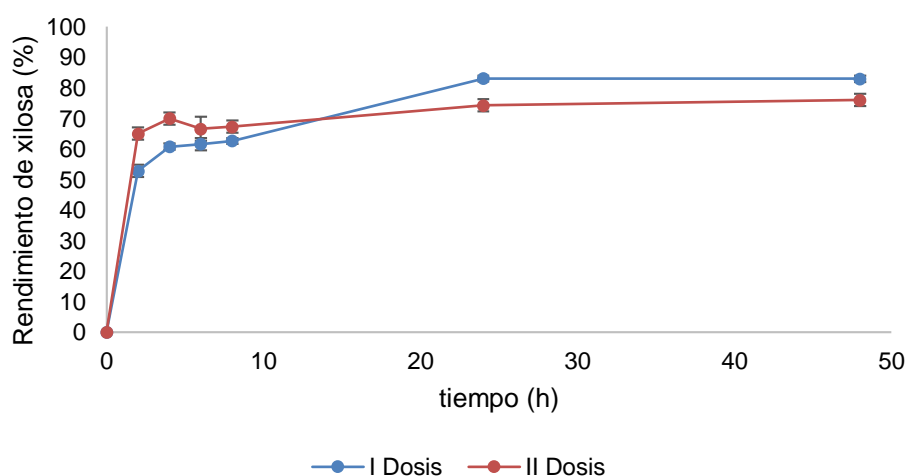


Figura 4-20. Rendimientos de xilosa liberada después de la hidrólisis enzimática con el líquido 5,5 veces concentrado a dos dosis diferentes y 50°C

El incremento del rendimiento de la reacción para la I dosis respecto a la II dosis a los 50°C puede deberse a la pérdida de estabilidad de las enzimas a esta temperatura durante tiempos más largos de incubación. Finalmente, se demuestra con estas dos curvas de progreso que la reacción se estabiliza de las 24 a las 48 horas y, por lo tanto, no es necesario dejar la reacción hasta 72 horas, lo que permite entonces escoger como tiempo de proceso tan solo 24 horas de reacción.

La falta de ciertas actividades enzimáticas puras de familias específicas que aún no se comercializan en el mercado o que simplemente no se disponía de ellas en el laboratorio, implicó que no se alcanzará a hidrolizar el 100% los AX extraídos de la cascarilla de cebada con la tecnología del SE. Sin embargo, es de resaltar que el objetivo de este trabajo se cumplió con una amplia expectativa, ya que no solamente se obtuvieron rendimientos de xilosa cercanos al 90% en 24 horas de reacción, sino que se logró hidrolizar por primera vez un líquido con una alta concentración de oligosacáridos que representaban un potencial de hidrólisis de 67% de xilosa, lo que implicaba hidrolizar hasta una concentración de 50g/L de xilosa total, con la presencia de aproximadamente 23-30 g/L de xilosa ya libre en el medio, superando efectos relacionados con mecanismos de inhibición en este tipo de reacciones.

Estos ensayos permitieron corroborar a su vez, la presencia de ramificaciones de grupos acetilo, grupos ferúlicos esterificados a la Araf, la presencia de ácidos urónicos y por supuesto también de las sustituciones de Araf en la cadena principal y de los xilo-oligosacáridos DP2-DP4 y >DP4 extraídos de la cascarilla de cebada con el SE, aunque la Araf sustituida no tuvo una mayor influencia en la liberación de xilosa, lo cual desde el punto de vista técnico y económico es muy interesante para esta opción de proceso.

▪ **Ensayo con enzimas comerciales**

En la Figura 4-21 se observa el rendimiento de glucosa liberada a las 24 y 48 horas de reacción del líquido concentrado con las enzimas comerciales de manera individual y combinadas entre ellas, la única enzima que no liberó glucosa de este medio ni a las 24 ni 48 horas fue Ultraflo L (rendimiento <10%), el resto de enzimas y sus combinaciones lograron por lo menos un 60% de rendimiento de este azúcar a las 24 horas de hidrólisis, obteniéndose el mayor rendimiento ~90% con la combinación de las tres enzimas en porcentaje iguales. A las 48 h de reacción se alcanzó aproximadamente el 100% de

rendimiento para la combinación de las enzimas Ultraflo L+Viscozyme L y para la mezcla de las tres enzimas, aunque el menor rendimiento que se obtuvo a este tiempo fue de ~85%. Los resultados obtenidos para estos ensayos demuestran la habilidad que tienen estos cocteles enzimáticos comerciales para hidrolizar principalmente oligómeros de glucosa extraídos de la celulosa en el líquido de pre-tratamiento con excepción de la enzima Ultraflo L.

Los tratamientos realizados con Celluclast 1.5 L y Viscozyme L resultaron en los mayores rendimientos de liberación de glucosa, ya que estas enzimas incluyen como principales actividades: endoglucanasas, celobiohidrolasas y β -glucanasas, como se observó en la Tabla 4-6. Estadísticamente, la diferencia de medias mostró que en el único ensayo donde no hubo diferencias significativas entre las 24 y 48 horas de reacción fue para la enzima Ultraflo L.

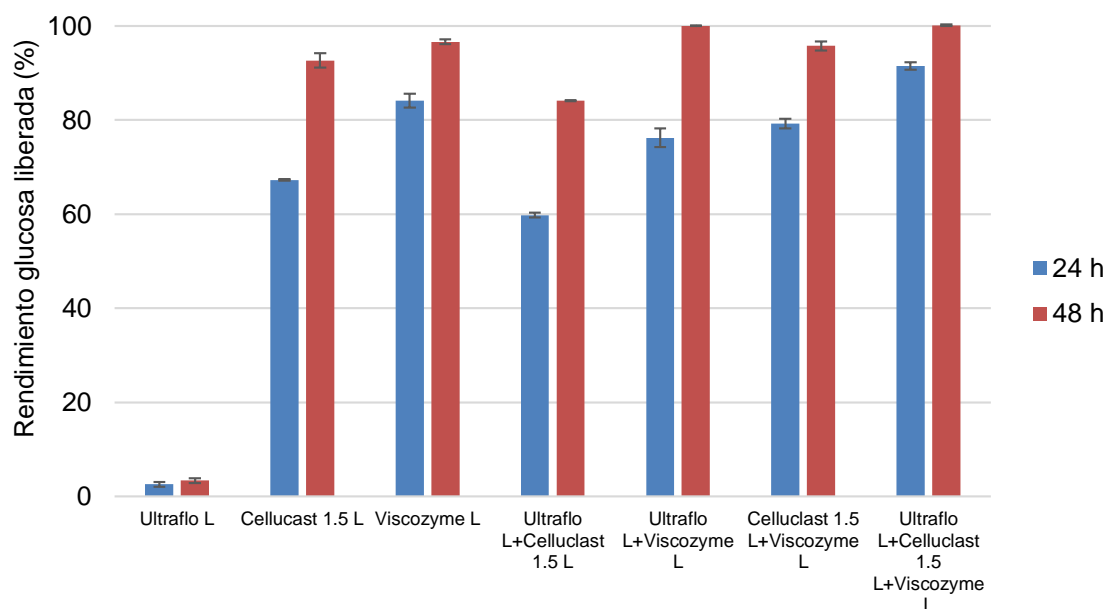


Figura 4-21. Rendimientos de glucosa liberada después de la hidrólisis enzimática a 24 (barras azules) y 48 h (barras rojas) de reacción con enzimas comerciales en forma individual y combinada

Sørensen, Pedersen, Viksø-Nielsen, & Meyer, (2005) quienes evaluaron también las preparaciones enzimáticas multicomponentes comerciales de Celluclast 1.5 L, Ultraflo L y Viscozyme L de manera individual, así como la mezcla 50:50 de Celluclast 1.5 L y Ultraflo L sobre los AX de trigo encontraron un máximo de 79,5% de rendimiento de glucosa con

Viscozyme L, seguido de un 39,7 y 35,6% para Celluclast 1.5 L y para la combinación 50:50 de Celluclast 1.5 L y Ultraflo L, respectivamente y un 29,9% para Ultraflo L, aunque ellos evaluaron la reacción solo hasta 6 horas.

En la Figura 4-22 se muestra el rendimiento de liberación de xilosa a 24 y 48 horas de reacción, para las 24 horas solo se evidencia ~4% de liberación de xilosa para la mezcla de las tres enzimas, mientras que a las 48 h de reacción se logra evidenciar que el resto de enzimas evaluadas comienzan a liberar xilosa, aunque en menor cantidad. Para las enzimas individuales Viscozyme L y Celluclast 1.5 L se obtiene un rendimiento inferior al 5%, seguido de un 3,7% para la mezcla Celluclast 1.5 L+Viscozyme L y, por encima de un 8% hasta máximo un 12% para la enzima Ultraflo L y el resto de combinaciones.

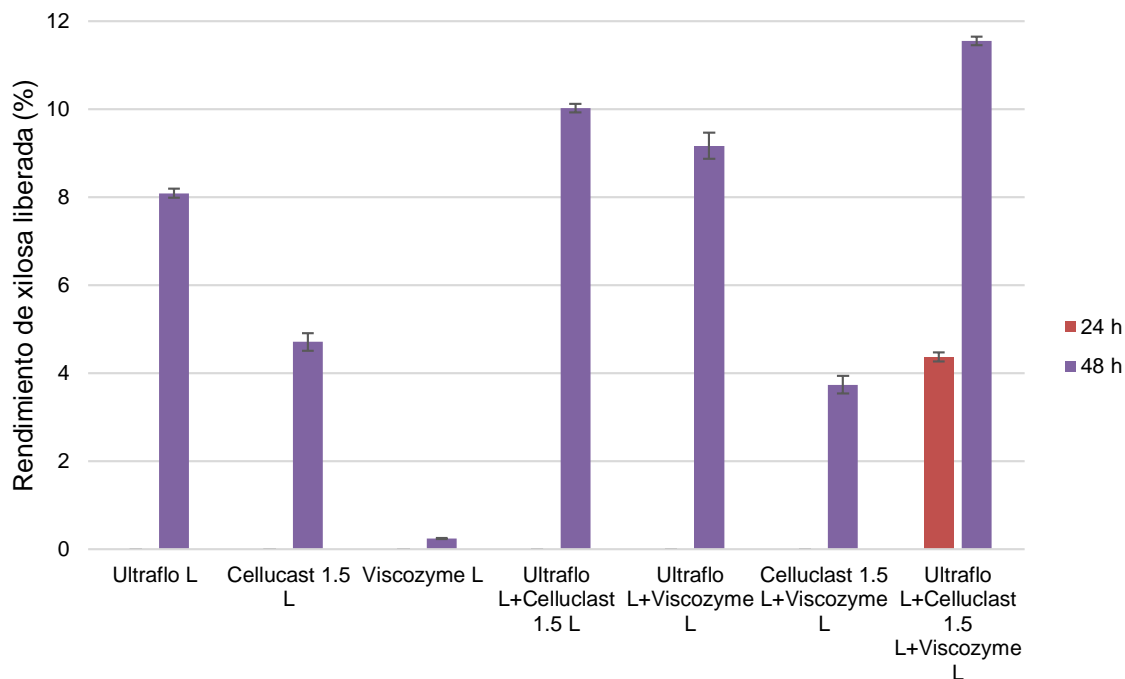


Figura 4-22. Rendimientos de xilosa liberada después de la hidrólisis enzimática a 24 y 48 h de reacción con enzimas comerciales en forma individual y combinada

En contraste, Sørensen et al., (2005) encontraron un máximo de 24,7% de liberación de xilosa con Celluclast 1.5 L, un 19,2 y 17,1% con Ultraflo L y con la mezcla 50:50 Celluclast 1.5 L+ Ultraflo L, respectivamente. El único resultado semejante entre los ensayos reportados por Sørensen et al., (2005) y el presente trabajo se dio con los resultados encontrados para la baja efectividad de Viscozyme L sobre la liberación de xilosa. Las

posibles diferencias que se obtuvieron entre estos ensayos y los realizados por Sørensen et al., (2005) pueden estar atribuidos a la diferencia de temperaturas, pH, concentración de sustrato y dosificación de las enzimas utilizadas. El incremento en el rendimiento de la liberación de xilosa por las combinaciones de las enzimas puede estar relacionado con el efecto sinérgico que presenta la mezcla con Ultraflo L del resto de enzimas, ya que se ha demostrado que esta enzima contiene entre otras actividades la enzima feruloil estearasa (Sørensen et al., 2005).

De otra parte, para el rendimiento de arabinosa se evidencia que con el uso de estas enzimas comerciales o sus combinaciones tampoco se obtuvieron rendimientos que superaran el 10% de liberación de arabinosa después de las 48 horas de reacción. Como se observa en la Figura 4-23, la mejor combinación que permitió el mayor rendimiento de liberación de arabinosa (8,7%) fue la mezcla Ultraflo L+Viscozyme L, la combinación y sinergia de estas enzimas permitió liberar un poco más de los azúcares de interés: xilosa y arabinosa en comparación con los resultados obtenidos con las enzimas de manera individual.

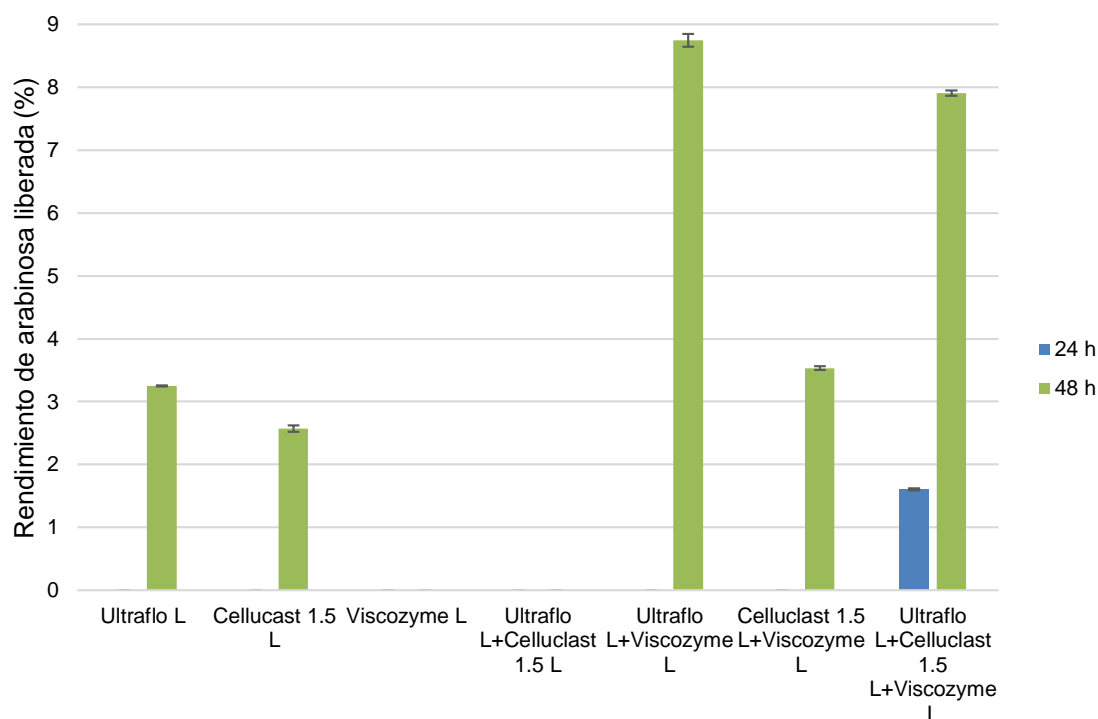


Figura 4-23. Rendimientos de arabinosa liberada después de la hidrólisis enzimática a 24 y 48 h de reacción con enzimas comerciales en forma individual y combinada

Sørensen et al., (2005) encontraron el porcentaje de rendimiento de liberación de arabinosa más alto para sus ensayos, 13,7% para Celluclast 1.5 L, 25,6% para Viscozyme L, 38,7% para la mezcla Celluclast 1.5 L:Ultraflo L y 45,8% para Ultraflo L, aunque atribuyen una mayor liberación de la arabinosa en función del nivel de dosificación, a mayor incremento de dosificación de 2 hasta 20% (p/p) consiguieron mayores valores de este azúcar, exceptuando para la enzima Celluclast 1.5 L, sin embargo, en el presente estudio la dosis de las enzimas fue única con un valor de 5% p/p y la concentración de sustrato considerablemente superior a la evaluada por Sørensen et al., (2005).

Finalmente, cabe destacar que en general estas enzimas comerciales y sus combinaciones son muy efectivas para lograr la liberación de glucosa del líquido de pre-tratamiento del SE en comparación con los azúcares hemicelulósicos extraídos en este. Sin embargo, la cantidad de xilosa y arabinosa liberadas alcanzó su punto máximo con las combinaciones de las tres enzimas o la mezcla de Ultraflo L+Viscozyme L y de Ultraflo L+Celluclast 1.5 L al 50:50, lo que reitera el efecto sinérgico de la enzima Celluclast 1.5 L quien contiene una o más actividades β -xilosidasa en su preparación, lo cual la hace efectiva para hidrolizar xilobiosa y xilotriosa, sumado a las actividades arabinofuranosidasas, hemicelulasas y xilanasas de Viscozyme L y Ultraflo L, además se destaca la presencia de la actividad feruloil estearasa en esta última enzima como la responsable de establecer aún más efecto sinérgico con las otras enzimas, ya que esta actividad enzimática es primordial para lograr un buen rendimiento de hidrólisis de xilosa en los líquidos de pre-tratamiento del SE, como se evidenció en el incremento del rendimiento de la liberación de xilosa con las enzimas comerciales puras evaluadas en la sección anterior.

Presuntamente, la falta de la actividad eficaz de la β -xilosidasa en la enzima Viscozyme L parece ser el cuello de botella para obtener una hidrólisis máxima de los AX con el tratamiento con esta única enzima. Cabe destacar que los ensayos realizados con estas enzimas comerciales solo se realizaron a una temperatura de 40°C y a una única dosis de 5% p/p, tal vez si se realizará un estudio más detallado de estas enzimas sobre los líquidos del pre-tratamiento del SE variando la temperatura, pH y dosificación, así como la suplementación de estos cocteles enzimáticos comerciales con actividades puras como la β -xilosidasa o estearasas podrían obtenerse tal vez mayores rendimientos de hidrólisis de los AX de la cascarilla de cebada, en comparación con los xilooligosacáridos de trigo evaluados por Sørensen et al., (2005) y Sørensen, Pedersen, & Meyer, (2007).

Por último, a continuación, se presentan los resultados obtenidos para los ensayos con la enzima comercial CellicTM Ctec I con y sin suplementación de β -xilosidasa, como segunda opción de proceso para evaluar la HE del líquido 5,5 veces concentrado con cocteles enzimáticos comerciales.

En la Figura 4-24 se representó el rendimiento de liberación de glucosa, en este se observa que a las 24 horas de reacción se obtiene un rendimiento máximo de ~75% para la dosis al 3%, a su vez a las 72 horas se alcanza un máximo de ~90% para la dosis 3 y 4%. A las 24 horas se observa una tendencia de incremento de liberación de glucosa con el incremento de la dosis, con excepción de la dosis al 4%, donde el rendimiento disminuye. A las 72 horas se observó más claramente el incremento del rendimiento con el incremento de la dosis.

Con la suplementación de la enzima β -xilosidasa se observó un efecto negativo en la liberación de glucosa, ya que a las 24 horas de reacción solamente fue perceptible un rendimiento del 8,6% para la dosis al 4%, mientras que, a las 72 horas, aunque el rendimiento se incrementó para todas las dosis, solo se alcanzó un máximo de 44% para la última dosis y la suplementación permitió que se incrementara de manera proporcional el rendimiento.

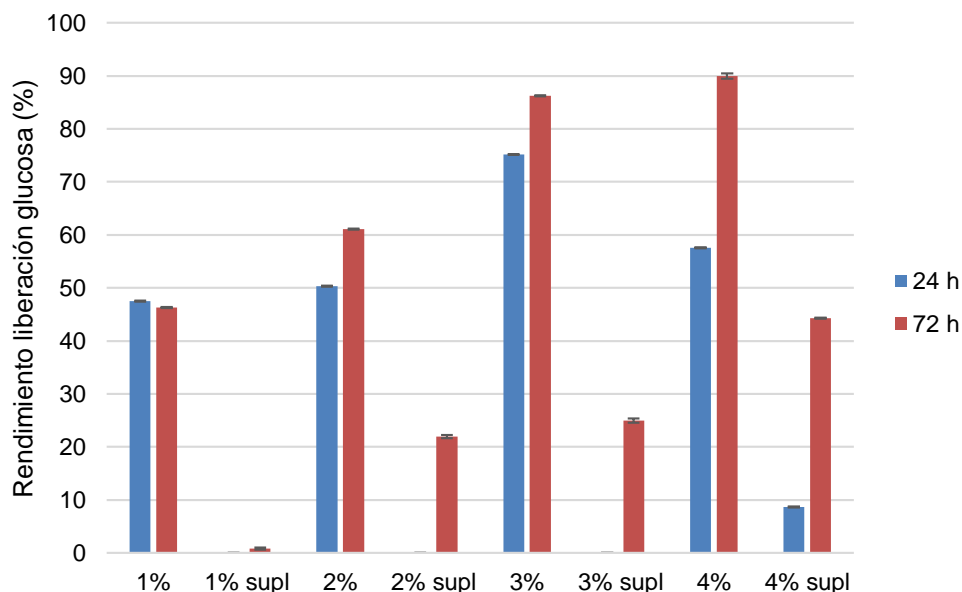


Figura 4-24. Rendimiento de glucosa liberada después de la hidrólisis enzimática a 24 y 72 h de reacción con la enzima CellicTM Ctec I con y sin suplementación de β -xilosidasa

En cuanto a la liberación de xilosa (Figura 4-25), se encontraron resultados positivos para esta enzima especialmente con la suplementación de β -xilosidasa. A las 24 horas de reacción se alcanzó un rendimiento máximo del 68,7% de xilosa con la dosis al 2% de Cellic™ Ctec I+ β -xilosidasa, sin suplementación el mayor porcentaje de rendimiento que se obtuvo a las 24 horas fue de 42,2% para la dosis AL 3%. Al cabo de 72 horas se alcanzó la mayor liberación de la xilosa para la dosis al 1%+ β -xilosidasa con un valor de 80,4%, aunque estuvieron muy cercanos los rendimientos obtenidos para las otras dosis con suplementación, ya que estos rendimientos variaron alrededor del 73 al 78%. Sin suplementación a las 72 horas de reacción, el máximo rendimiento que se alcanzo fue del 52,8% para la dosis al 4%, aunque estuvo muy cercano al valor obtenido en el ensayo para la dosis con un 51%.

La tendencia de liberación de xilosa con la enzima sin suplementación a las 24 horas fue creciente hasta la dosis al 3%, en la dosis al 4% el rendimiento disminuyó. A las 72 horas el rendimiento fue estadísticamente significativo por la diferencia entre medias y también fue creciente con la dosis. La tendencia con la enzima suplementada mostró que a las 24 horas la liberación aumentó de la dosis al 1% respecto a la dosis al 2% y disminuyó para la dosis al 3 y 4%. Para las 72 horas, el rendimiento fue el máximo para la 1% y disminuyó a través del incremento de la dosis. Por lo tanto, la mejor dosis y tiempo para lograr la máxima liberación de xilosa con el coctel enzimático comercial Cellic™ Ctec I correspondió al 1% suplementada con β -xilosidasa a 72 horas de reacción.

Con estos resultados se evidencia la necesidad de suplementar la enzima Cellic™ Ctec I, con la β -xilosidasa para lograr una mayor liberación de xilosa del medio de reacción. Adicionalmente se encontró una alternativa para hidrolizar el líquido obtenido en el pre-tratamiento y concentrado 5,5 veces con un buen rendimiento (78-80%), muy cercano al obtenido por la mezcla de enzimas puras con el porcentaje de combinación de las actividades específicas (Tabla 4-5), en el cual el rendimiento alcanzado fue ~84% para la II dosis en 24 horas de reacción.

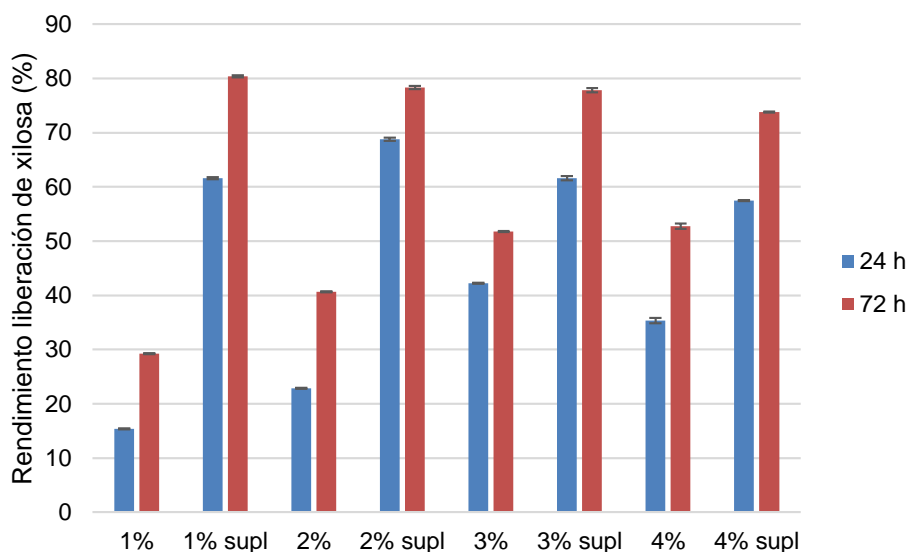


Figura 4-25. Rendimiento de xilosa liberada después de la hidrólisis enzimática a 24 y 72 h de reacción con la enzima Cellic™ Ctec I con y sin suplementación de β -xilosidasa

La principal diferencia entonces para el planteamiento de las posibilidades de proceso, radicarían principalmente en el tiempo de hidrólisis, para el ensayo con enzimas puras 24 horas de reacción fue un tiempo suficiente para alcanzar la máxima HE, mientras que para la enzima Cellic™ Ctec I suplementada con β -xilosidasa, fueron necesarias 72 horas de reacción para alcanzar un rendimiento de xilosa similar.

Finalmente, se evaluó la liberación de arabinosa, en la Figura 4-26 se muestran los resultados obtenidos para este azúcar. A las 24 h de reacción para los ensayos en los cuales se agregó la enzima sin suplementación, se obtuvo un rendimiento de liberación progresiva de arabinosa con el incremento de la dosis, obteniéndose rendimientos cercanos al 100% para la dosis al 3 y 4% v/v.

Sin embargo, para los ensayos en los cuales se suplementó la enzima con la β -xilosidasa, a las 24 horas de reacción no se encontró una tendencia clara en relación con las dosis adicionadas, pero se encontró una mayor liberación de arabinosa (54%) con la dosis al 2%, escenario que cambió radicalmente a las 72 horas, donde se obtuvieron rendimientos cercanos al 100% para todas las dosis suplementadas y para las dosis 2, 3 y 4% sin suplementación.

Estadísticamente, la diferencia entre medias a las 24 y 72 horas mostró que no existen diferencias significativas entre la dosis al 3 y 4% sin suplementación. Y para la enzima

suplementada se evidencio que a las 24 horas de reacción hay diferencias significativas entre las medias de los cuatro ensayos y a las 72 horas no hay diferencias significativas con la dosis al 2, 3 y 4%, pero estas tres si difieren de la dosis al 1%.

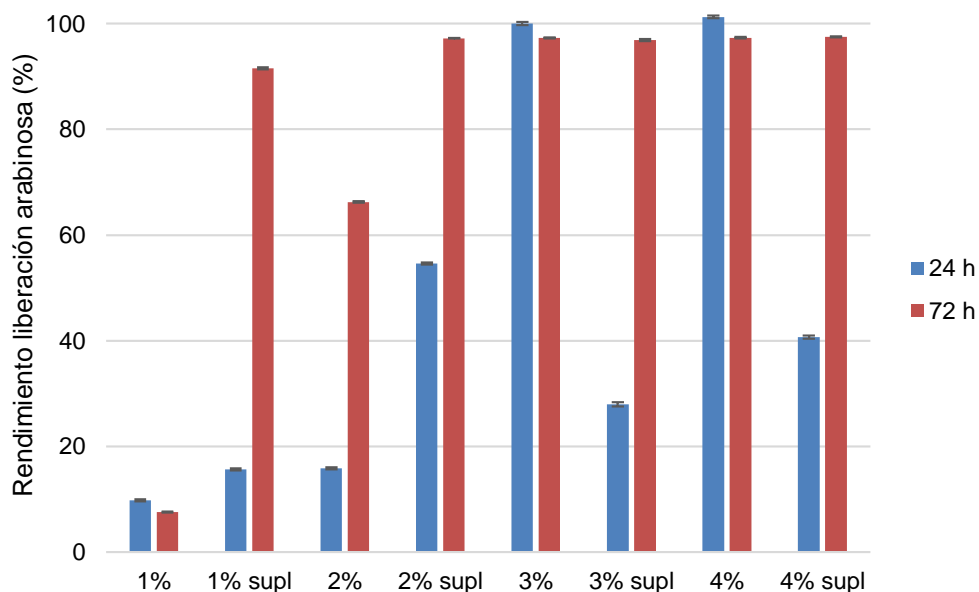


Figura 4-26. Rendimiento de arabinosa liberada después de la hidrólisis enzimática a 24 y 72 h de reacción con la enzima CellicTM Ctec I con y sin suplementación de β -xilosidasa

▪ Hidrólisis enzimática WIS

En la Figura 4-27 se presentan los rendimientos de glucosa y xilosa liberados después de la HE sobre los WIS obtenidos en los ocho ensayos planteados en el diseño experimental, el rendimiento de glucosa vario de 59,7 hasta 77,8% para los ensayos con impregnación con ácido, mientras que para los dos ensayos sin impregnación solo se obtuvo un 18,7%. Los ensayos a 170 y 180°C tuvieron rendimientos semejantes entre sí y se distanciaron solamente en un 10-15% respecto a los resultados obtenidos para la temperatura a 160°C, el tiempo no tuvo una incidencia significativa. Kemppainen et al., (2016) también reportaron hasta un 72% de rendimiento de hidrólisis para los glucanos de la cascarilla de cebada previamente pre-tratada con SE, aunque ellos usaron una carga de 3%, mientras que en este estudio se realizó al 5% p/v, cabe destacar que los ensayos realizados por Kemppainen et al., (2016), fueron sobre la cascarilla original pre-tratada por SE sin realizar una etapa previa de desproteinización de la biomasa.

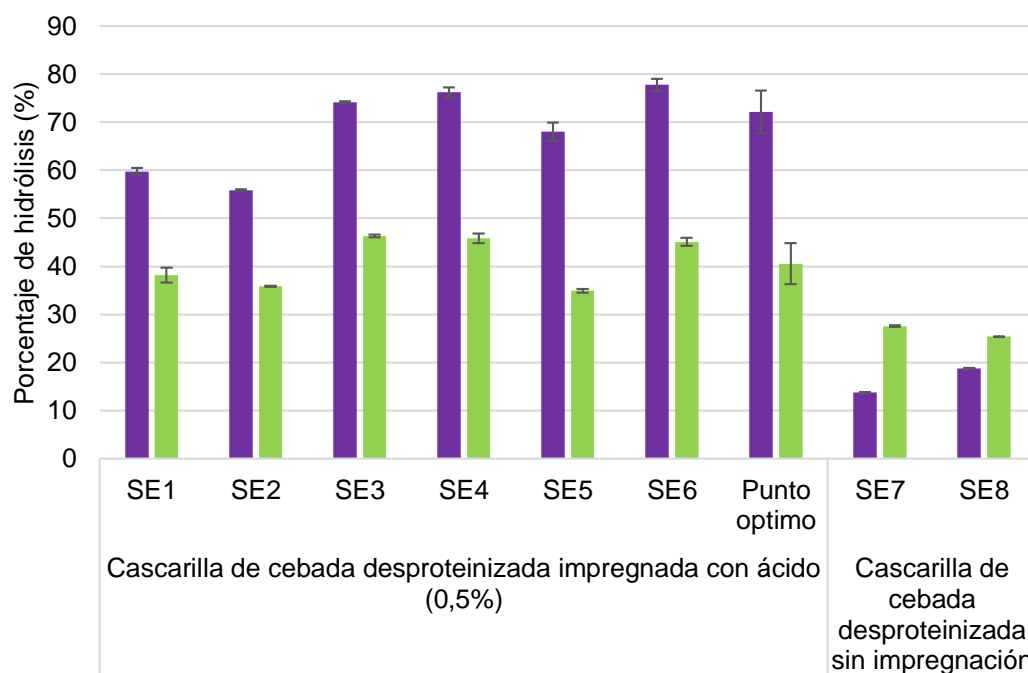


Figura 4-27. Rendimiento de HE sobre los WIS, glucosa (barras moradas) y xilosa (barras verdes) con la enzima Cellic™ Cetec II por 72 horas de reacción

En cuanto al rendimiento de xilosa, se observa un porcentaje de rendimiento de 35-45% de xilanos para los ensayos con la biomasa desproteínizada y previamente impregnada con ácido y un 27,6% para los ensayos sin impregnación, estos resultados también estuvieron acordes con el máximo de 35% logrado por Kemppainen et al., (2016) para esta fracción. En el único ensayo donde no hubo diferencias significativas entre las medias, fue para la temperatura de 170°C, para los restantes ensayos estadísticamente hubo diferencias significativas, por tanto, el tiempo de pre-tratamiento para la temperatura de 180°C fue importante para dejar un sólido más asequible al ataque enzimático en la fracción residual de xilano.

En este análisis de la HE de los WIS se observó el comportamiento de los sólidos remanentes que no solamente habían sido pre-tratados con el SE sino también previamente desproteínizados biotecnológicamente, de manera general se encontró que el realizar una etapa previa de desproteínización sobre la cascarilla de cebada permitió incrementar la accesibilidad de las enzimas sobre la celulosa y los AX residuales en la biomasa, aunque para lograr rendimientos superiores en la hidrólisis del xilano, es necesario así como para la fracción líquida suplementar los cocteles enzimáticos

comerciales con actividades puras accesorio tipo α -L-arabinofuranosidasas y estearasas (Faulds, Sancho, & Bartolomé, 2003).

El proceso planteado en esta investigación contempló principalmente la producción de xilitol a partir de la cascarilla de cebada del proceso cervecero empleando la combinación del pre-tratamiento de SE con la hidrólisis enzimática y fermentación, sin embargo, en el contexto de una biorrefinería lograr el punto de equilibrio para que el proceso sea económicamente viable implica que las demás fracciones que se obtienen como corrientes laterales del proceso: proteínas, péptidos, oligopéptidos, WIS, puedan también valorizarse para obtener otros productos químicos de alto valor agregado.

4.3.8 Fermentación

Los ensayos de fermentación a nivel matraz Erlenmeyer se realizaron con el objetivo de evaluar la toxicidad del medio sobre la cepa *Candida guilliermondii* FTI 20037. Para ello, primero se compararon los perfiles de crecimiento celular, consumo de sustrato y formación de producto a través del tiempo, para el líquido crudo y el líquido 5,5 veces concentrado a un pH de 4,5 y 5,5.

- **Ensayos en Erlenmeyer**

En la Figura 4-28 se presenta la caracterización del líquido crudo y 5,5 veces concentrado respecto a los inhibidores de fermentación previo a la etapa de HE. De la comparación de los dos líquidos se hace evidente que todos los inhibidores se concentran al evaporarse el líquido de pre-tratamiento, a excepción del furfural, este es el único inhibidor que disminuye su concentración, pasa de 0,616 a 0,025 g/L. Así, el inhibidor más representativo en el líquido 5,5 veces concentrado correspondió al ácido acético con un valor de 0,623 g/L. La concentración total de inhibidores de fermentación para el líquido crudo fue de 1,074 g/L y para el líquido 5,5 veces concentrado fue de 1,516 g/L.

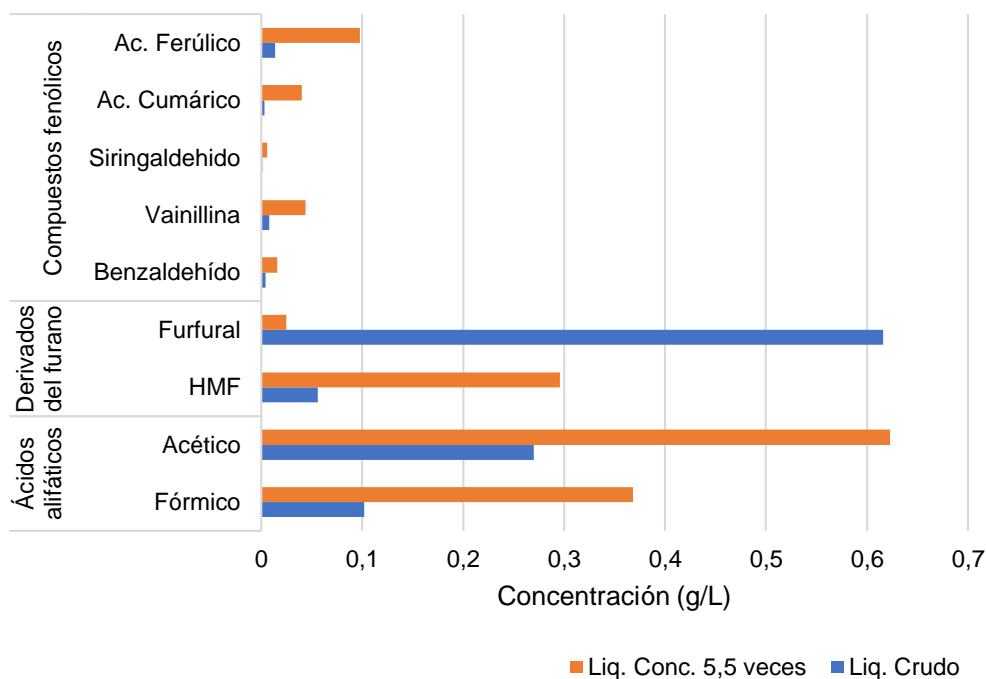


Figura 4-28. Concentración de inhibidores de fermentación en el líquido crudo y 5,5 veces concentrado

En el líquido crudo el 34,6% correspondió entonces a los ácidos alifáticos, el 62,6% a los derivados del furano y el restante 2,8% a compuestos fenólicos. En contraste, en el líquido 5,5 veces concentrado el mayor aporte de los compuestos inhibitorios correspondió a los ácidos alifáticos con un 65,4%, seguido de los derivados del furano con un 21,2%, mientras que los compuestos fenólicos se incrementaron hasta el 13,5%.

En la Figura 4-29 y 4-30 se observa el perfil de crecimiento celular, consumo de xilosa y producción de xilitol a través del tiempo, para el líquido crudo y el líquido 5,5 veces concentrado respectivamente. En estas figuras, se observa que después de las 3,5 horas empieza el consumo de xilosa y la producción de xilitol para el líquido crudo, mientras que para el líquido 5,5 veces concentrado, el consumo de xilosa comienza desde las 3,5 horas, pero la producción de xilitol se demora y comienza hasta las 50,5 horas, ya que en las primeras 24 horas el microorganismo para crecer tiene que adaptarse al medio y la xilosa que consume la destina exclusivamente a la formación de biomasa como herramienta de supervivencia, antes que a la producción de xilitol, lo cual puede relacionarse con la diferencia de concentración del ácido acético en los dos medios, los ácidos alifáticos

inhiben la producción de masa celular, pero no la fermentación en si misma (Mills, Sandoval, & Gill, 2009).

La fermentación para el líquido crudo, terminó aproximadamente a las 72 horas con un consumo del 98,3% de sustrato, mientras que para el líquido 5,5 veces concentrado se demoró hasta las 144 horas y se consumió un 3,5% menos de sustrato respecto al líquido crudo. Finalmente, cabe destacar que para el líquido 5,5 veces concentrado se produjo más biomasa que para el líquido crudo, el rendimiento $Y_{P/S}$ para los dos líquidos fue de 0,54 g/g y la productividad fue de 0,54 y 0,24 g/L/h para el líquido crudo y el líquido 5,5 veces concentrado, respectivamente.

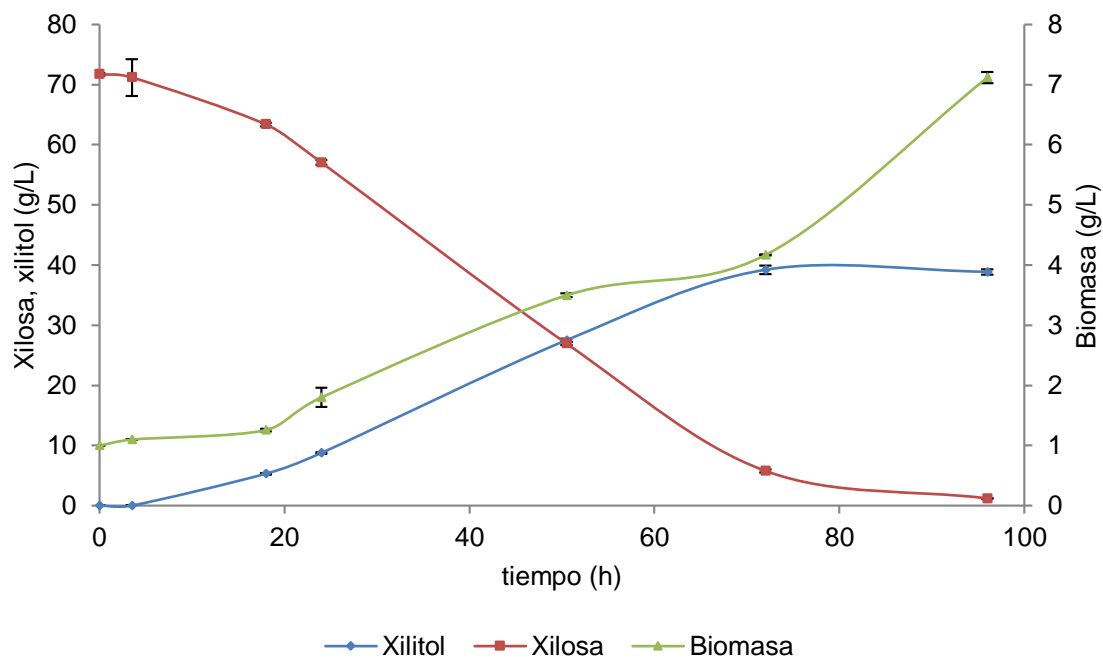


Figura 4-29. Perfiles de crecimiento celular, consumo de xilosa y producción de xilitol, ensayo toxicidad sobre el líquido crudo a un pH de 4,5

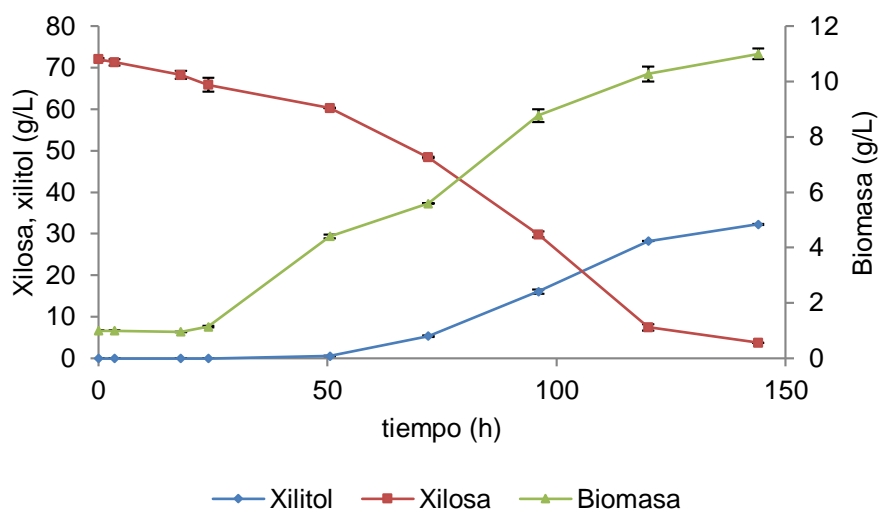


Figura 4-30. Perfiles de crecimiento celular, consumo de xilosa y producción de xilitol, ensayo toxicidad sobre el líquido 5,5 veces concentrado a un pH de 4,5

En la Figura 4-31 se observa el perfil de crecimiento celular, consumo de sustrato y producción de xilitol para el líquido 5,5 veces concentrado a un pH de 5,5, la diferencia del ajuste del pH de 4,5 a 5,5 permitió establecer que el tiempo de fermentación disminuyera a 96 horas. Esta vez el microorganismo comienza a producir xilitol a las ~18 h, mientras que en el líquido 5,5 veces concentrado a pH 4,5 la levadura solo comenzaba a producir xilitol desde las 50,5 horas. En la curva de crecimiento celular para el líquido 5,5 veces concentrado a pH 5,5, el consumo de sustrato fue de 95,1%, el rendimiento $Y_{P/S}$ disminuyó a 0,45 g/g y la productividad aumentó a 0,44 g/L/h.

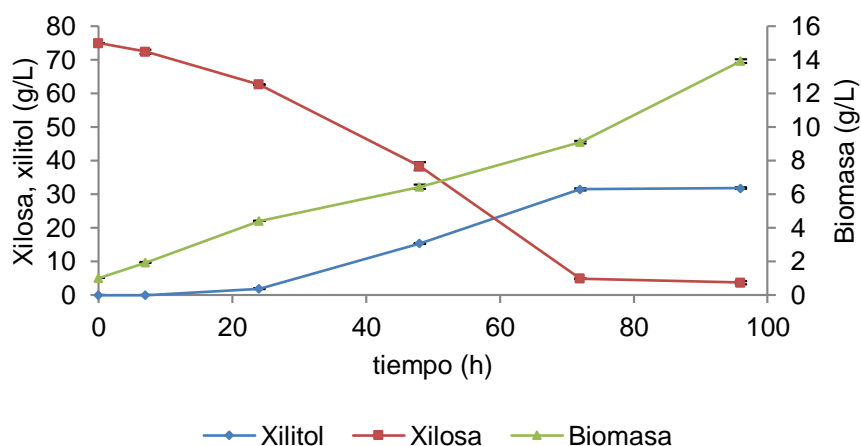


Figura 4-31. Perfiles de crecimiento celular, consumo de xilosa y producción de xilitol, ensayo toxicidad sobre el líquido 5,5 veces concentrado a un pH de 5,5

El pH externo tiene un gran efecto sobre la toxicidad de los ácidos débiles. Uno de los mecanismos propuestos para explicar el efecto inhibitorio de los ácidos alifáticos es la teoría del desacoplamiento. Según esta, el efecto tóxico depende del pKa de los ácidos y del pH del medio. Únicamente la forma no disociada de los ácidos penetra en la célula por difusión, donde, debido al mayor pH intracelular se disocia, provocando un descenso del pH que debe ser compensando por una ATPasa de membrana que bombea protones al exterior a costa de la hidrólisis de ATP. La menor disponibilidad de ATP para la formación de biomasa celular conduce a la disminución en el crecimiento (Oliva Domínguez, 2003).

Estos “agentes de desacoplamiento” interrumpen el potencial de pH transmembranal ya que, efectivamente, se permite la creación de un protón a través de la membrana sin la creación de ATP. Esta disociación del ácido débil dentro del citoplasma se debe al hecho de que el pH intracelular, pH_i , está naturalmente a un pH de aproximadamente 7,8, que es mucho más alto que el pKa del ácido débil. A medida que estos ácidos se disocian dentro de la célula, el pH_i disminuye, lo que puede inhibir el crecimiento. El ácido fórmico puede ser más tóxico debido a que tiene una permeabilidad extraordinariamente alta a través de la membrana. Este efecto de pH externo se debe, en parte, al hecho de que el ácido existe en su forma no disociada en concentraciones más altas, lo que permite una mayor permeabilidad de la membrana celular (Mills et al., 2009).

Wang et al., (2015) reporta que después de 15 horas de inoculación, las concentraciones de ácido acético y furfural no fueron detectables, lo que significa que estos compuestos se degradaron a compuestos menos tóxicos para la célula. Wang et al., (2015) presentan como estrategia para superar la inhibición de los productos tóxicos generados en el SE de paja de maíz, el aumento del tamaño del inóculo a 1,6 g/L; con esta estrategia ellos reportan una concentración máxima de xilitol de 35,6 g/L, después de tan solo 38 h de fermentación con una productividad de 0,94 g/L/h y un rendimiento de 0,71 g/g sobre un hidrolizado proveniente de un tratamiento con SE.

La única etapa de “detoxificación” realizada se hizo mediante la evaporación al vacío del líquido de pre-tratamiento. Aunque existen otros métodos para retirar los compuestos inhibitorios como el uso de carbón activado, tratamiento con hidróxidos o resinas de intercambio iónico o inclusive mediante la combinación de estos métodos (Huang et al., 2011), cada vez más la etapa de detoxificación de los medios tiende a no realizarse (Huang

et al., 2011; Ping et al., 2013; Wang et al., 2015), ya que se ha atribuido que la detoxificación puede reducir la concentración de los azúcares reductores, lo cual disminuiría la eficiencia de la fermentación.

- **Ensayos en reactor 1 L**

Otro problema asociado durante la etapa de detoxificación tiene que ver con los requerimientos de químicos adicionales, los cuales no pueden reusarse y adicionalmente al realizarse una etapa adicional de detoxificación se incurre en implicaciones económicas que imposibilitarían el escalamiento de los procesos. Sin embargo, la etapa de evaporación realizada en esta opción de proceso no solamente permitió concentrar la xilosa potencial extraída en el líquido de pre-tratamiento hasta un valor adecuado de sustrato para la posterior fermentación, sino que, paralelamente, permitió modificar la concentración de los compuestos inhibitorios. La concentración de los compuestos inhibitorios iniciales y finales en la fermentación se presentan en la Figura 4-32. El porcentaje en peso de ácidos alifáticos en el líquido inicial fue del 76,4% y los derivados del furano y compuestos fenólicos se presentaron en porcentajes semejantes de 11,4 y 12,2% respectivamente.

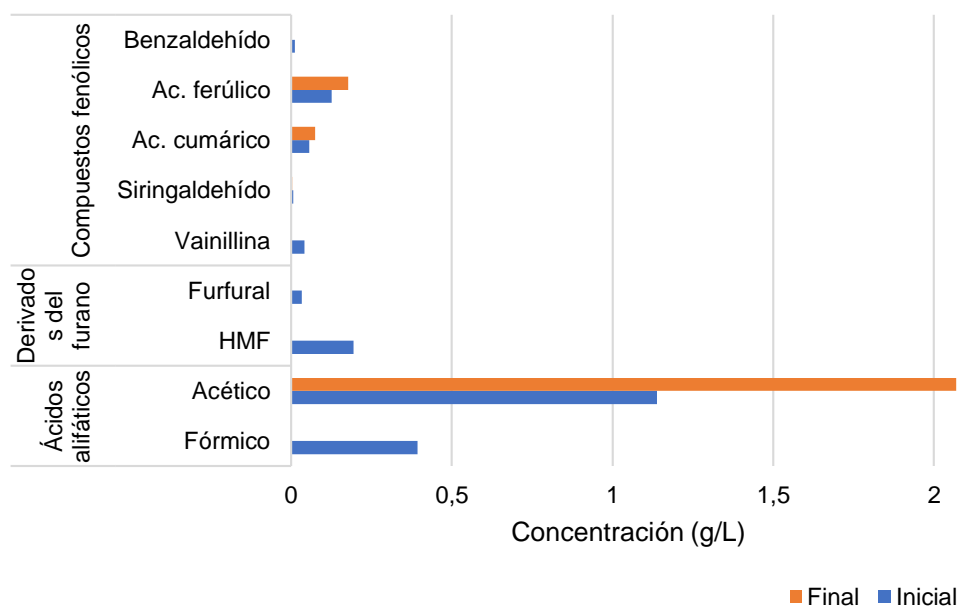


Figura 4-32. Concentración de los compuestos inhibidores de fermentación al tiempo inicial y final de la fermentación en el biorreactor de 1 L para el líquido concentrado 5,5 veces

El proceso fermentativo para la producción de xilitol se ha convertido en una opción interesante desde el punto de vista económico, dado que no se requiere la purificación del jarabe de xilosa como en el proceso químico. Sin embargo, el éxito del proceso fermentativo para la producción de xilitol depende de la productividad de la cepa y de su tolerancia a los diferentes compuestos químicos presentes en los hidrolizados. Sumado a esto, se ha demostrado que un número de parámetros de cultivo, como el pH, composición del medio y nivel de aireación, tienen un efecto significativo en la producción de xilitol a partir de los medios hidrolizados de hemicelulosa.

Una de las variables de control más importantes en esta bioconversión es el nivel de aireación, el cual afecta las rutas bioquímicas involucradas en el metabolismo de la xilosa. La producción de la biomasa se favorece por condiciones aeróbicas, mientras que el xilitol se forma bajo condiciones limitadas de oxígeno. Los trabajos recientes que se encuentran publicados sobre la evaluación del parámetro de transferencia de oxígeno en la producción de xilitol (Roberto, de Mancilha, & Sato, 1999; Aguiar, Faria, Couto, Araujo, & Pereira, 2002; Zou, Qi, Chen, Miao, & Zhong, 2010; Soleimani & Tabil, 2014), fueron la pauta para escoger un nivel de agitación y aireación que permitieran a su vez establecer un valor de k_{La} y así ajustar este parámetro en la fermentación del hidrolizado obtenido de la cascarilla de cebada, mediante el método dinámico (sección 3.2.10).

En esta parte del estudio no fue posible estudiar más valores de k_{La} , por la gran cantidad de hidrolizado que debía obtenerse para realizar variaciones de los parámetros de agitación y aireación, entonces para realizar la fermentación a las mejores condiciones, se ajustó este parámetro a un valor constante de $15h^{-1}$ (Anexo B) según las referencias bibliográficas tomadas de Roberto et al., (1999) y Soleimani & Tabil, (2014) quienes al igual que en esta investigación, trabajaron con la cepa *Candida guilliermondii* FTI 20037 e hidrolizados reales de hemicelulosas de paja de arroz y cascarillas de avena, respectivamente, aunque ellos emplearon el pre-tratamiento e hidrólisis simultánea con ácido sulfúrico.

Para el primer caso Roberto et al., (1999) variaron la aireación entre 0,5-1,7 vvm a un valor constante de agitación (300 rpm), con una aireación de 1,3 vvm ajustaron el valor de k_{La} a $15h^{-1}$, a este valor de coeficiente de transferencia de masa, ellos encontraron el máximo rendimiento de producción de xilitol correspondiente a 0,73 g/g con una Q_p de 0,52 g/L/h.

Soleimani & Tabil, (2014) variaron también la aireación desde 0,13 hasta 2 vvm con una agitación constante de 200 rpm, ellos determinaron un valor de k_{La} de $15,8h^{-1}$ a 1,25 vvm, donde obtuvieron la mayor concentración de xilitol (55g/L), correspondiente a un rendimiento de 0,87 g/g y una Q_P de 0,57 g/L/h.

En la etapa de pre-sacarificación de este estudio se alcanzó un rendimiento del 64% de xilosa con la dosis de Cellic™ Ctec I al 1% v/v suplementada con 0,1 mg de β -xilosidasa/g AX potencial a las 24 horas de reacción, esto implicó que la concentración inicial de sustrato no fuera el teórico ~74 g/L de xilosa, sino que la concentración de sustrato de partida fuera de 56,12 g/L, adicionalmente la enzima Cellic™ Ctec I+ β -xilosidasa hidrolizó parcialmente los glucanos extraídos en el líquido, con lo cual el medio inicial presentó 13,9 g/L de glucosa, lo que representó un rendimiento de hidrólisis del 34,6% para esta fracción. En la Figura 4-33 se ilustra el perfil de crecimiento celular, consumo de sustrato y producción de xilitol a través del tiempo.

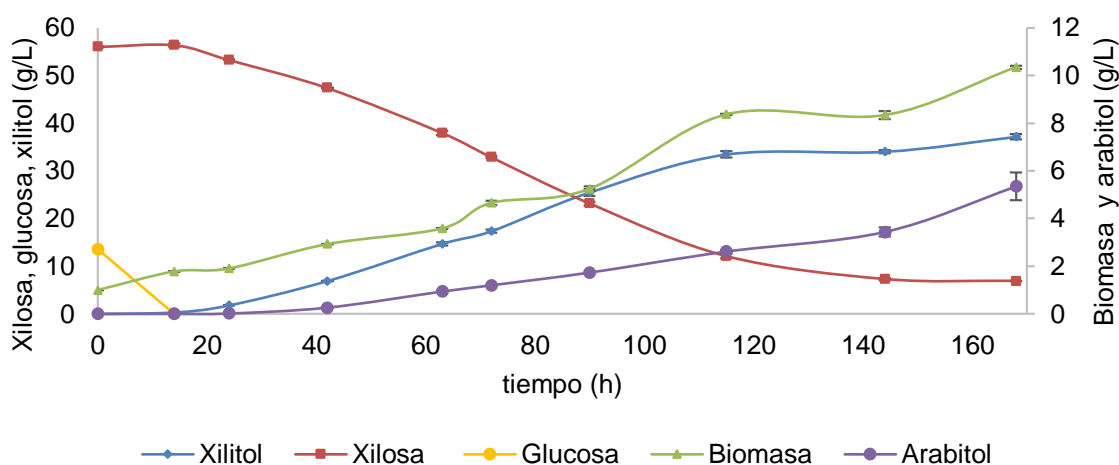


Figura 4-33. Perfiles de consumo de xilosa y glucosa, producción de xilitol (eje y-izquierdo), crecimiento celular y producción de arabitól (eje y-derecho), ensayo para el líquido 5,5 veces concentrado con k_{La} de $15 h^{-1}$

La presencia de glucosa en el medio, pudo servir para el crecimiento de la biomasa y/o para la producción de etanol (Figura 4-34), ya que la cepa de *Candida guilliermondii* FTI20037 también metaboliza hexosas y produce etanol a partir de este sustrato (Wen et al., 2016). La eliminación de este azúcar a las 14 horas de fermentación, permitió observar como el metabolismo del microorganismo se adapta al consumo del siguiente azúcar de preferencia la xilosa, así mismo, allí se comienza a observar la producción de xilitol como

metabolito primario asociado al crecimiento celular. Aunque la glucosa puede causar represión catabólica del consumo de xilosa (Kastner, Eiteman, & Lee, 2001; Walther, Hensirisak, & Agblevor, 2001), algunos estudios han indicado que la glucosa tiene un efecto positivo sobre el metabolismo de la xilosa e inclusive han sugerido relaciones óptimas de glucosa a xilosa (1:5 a 1:10) para mejorar el rendimiento del xilitol (Huang et al., 2011).

En el estudio realizado por Huang et al., (2011), el contenido de glucosa en el hidrolizado de paja de arroz (~9 g/L) no alcanzó a genera inhibición por sustrato, así como se observó en esta investigación. Por tanto, puede concluirse que pequeñas cantidades de glucosa presentes en el hidrolizado no tiene un efecto en la producción general de xilitol. La sacarificación simultánea con la fermentación no se logró por dos razones, la temperatura de fermentación se ajustó a un valor de 30°C, valor diez grados inferior a la temperatura óptima para la acción de la enzima Cellic™ Ctec I+β-xilosidasa para que se pudiera dar inicio a la fermentación, además la presencia de etanol en las reacciones mixtas por ejemplo, durante la sacarificación y fermentación simultánea, permite la transferencia de los residuos xilosilo al etanol en vez de al agua, lo cual permite la formación de etil β-glucósidos, una reacción que es reversible (Biely et al., 2016).

La producción de xilitol se comenzó a estabilizar a las 115 horas con un valor de 33,5 g/L y se alcanzó un máximo a las 168 horas con 37,2 g/L, el mayor rendimiento $Y_{P/S}$ alcanzado a estas dos horas correspondió a 0,76 g/g con una Q_P de 0,29 g/L/h y 0,22 g/L/h, respectivamente. El consumo de sustrato fue de tan solo el 78% y a las 42 horas se comenzó a detectar la producción de arabitol por ende esto refleja también el consumo de arabinosa, tercer azúcar de preferencia por la cepa (datos no mostrados en las gráficas, debido a que el pico de arabinosa en los cromatogramas coeluye con el de etanol), por esta razón el perfil de biomasa después de las 168 horas sigue en aumento.

Para este ensayo, adicionalmente se realizó el seguimiento de los principales compuestos inhibitorios, así como de etanol y glicerol producidos a lo largo de las primeras 90 horas de la fermentación (Figura 4-34). En cuanto al ácido acético, se observa que el valor inicial fue de 1,14 g/L, valor superior al reportado en la Figura 4-28, debido a la liberación de grupos acetilo después de la HE realizada en la etapa de pre-sacarificación, el mismo

incremento se observó para el ácido cumárico y ferúlico. El aumento del ácido acético en las primeras 24 horas del tiempo inicial puede deberse a que en la fermentación se producen múltiples productos derivados del metabolismo celular, inclusive asociados a la primera etapa del consumo de glucosa.

Al final de la fermentación no se detectan los derivados del furano, lo que indica que el furfural y el HMF fueron metabolizados por la levadura. En condiciones de anaerobiosis, como consecuencia del metabolismo del furfural, se produce principalmente alcohol furfúrico y, en menor concentración, ácido furoico. La hipótesis de que la reducción de furfural a alcohol furfúrico está catalizada por un alcohol deshidrogenasa dependiente de NADH está prácticamente aceptada. En condiciones de anaerobiosis, durante la fermentación se produce glicerol para regenerar el exceso de NADH producido en la biosíntesis y mantener el balance redox intracelular. En fermentaciones en presencia de furfural no se observa producción de glicerol, lo que sugiere que la reducción del furfural a alcohol furfúrico oxida el NADH en condiciones de anaerobiosis (Oliva Domínguez, 2003), en este ensayo sucede exactamente este comportamiento, los derivados del furano desaparecen y se evidencia la producción de glicerol a lo largo del tiempo, a pesar de que el sistema no se encuentra en condiciones de 100% anaerobiosis la producción de xilitol por *Candida guilliermondii* FTI 20037 se realiza a condiciones limitadas de oxígeno, lo cual podría favorecer la metabolización de estos compuestos y por ende la generación de glicerol, como se observa en las Figuras 4-33 y 4-34.

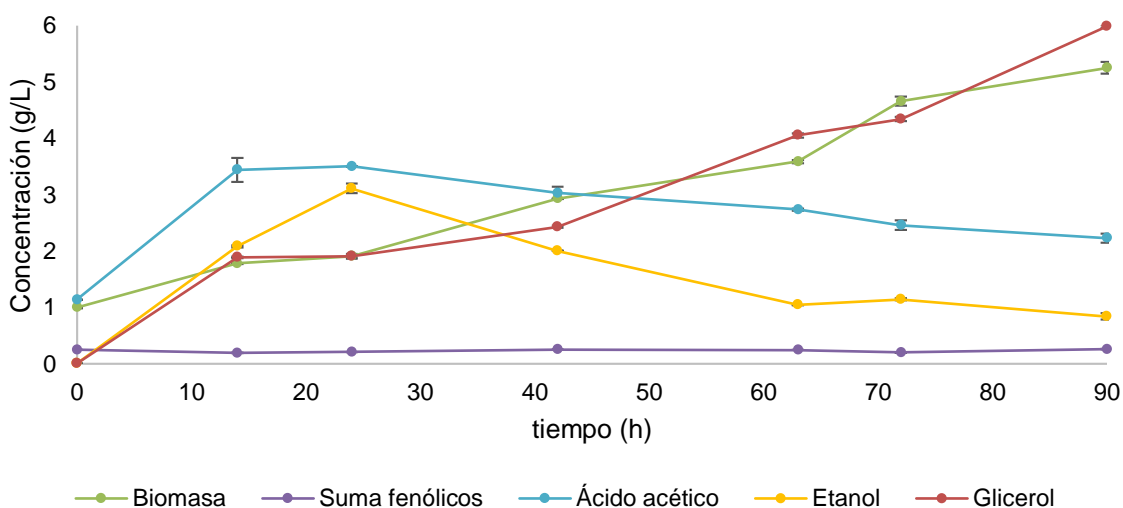


Figura 4-34. Perfil de crecimiento celular, ácido acético y suma de fenólicos, producción de etanol y glicerol a través del tiempo, para la fermentación en biorreactor a 1 L

El etanol se produce como respuesta a la presencia de glucosa en el medio, su valor máximo fue de 3,1 g/L, aunque este después de las 24 horas disminuye, debido posiblemente a la evaporación que sufre en el medio por las condiciones de aireación y agitación constantes o incluso debido a estas mismas condiciones de aireación, el etanol pudo ser consumido por la levadura, ya que este podría pasar a la formación de ATP y biomasa mediante la respiración aerobia. Los compuestos fenólicos, permanecen más o menos constantes a lo largo de la fermentación, lo cual podría indicar que la levadura tolera a estos compuestos en el medio, pero no los metaboliza, lo que finalmente se podría manifestar en la disminución de la velocidad específica de crecimiento del microorganismo y por ende se refleja en los bajos valores de productividades encontrados para este ensayo.

4.4 Conclusiones

El mayor rendimiento de extracción de xilosa de la cascarilla de cebada sin desproteínizar mediante el pre-tratamiento del SE correspondió a un 30,7% para las condiciones de 190°C por 5 min, impregnando el material con ácido.

La impregnación de la cascarilla de cebada con ácido previa al tratamiento del SE es esencial para lograr incrementar la extracción de la fracción de hemicelulosa en el líquido de tratamiento tanto para la cascarilla original y desproteínizada.

Se demostró que la presencia principalmente de proteína y almidón en la cascarilla de cebada generan un efecto barrera en el pre-tratamiento del SE afectando la transferencia de masa y calor sobre esta biomasa.

El proceso de desproteínización y eliminación de almidón simultáneo de la cascarilla de cebada realizado por medio de Alcalase® 2.5 L, permitió la remoción del 70,6% y 63,9% de la proteína inicial de la biomasa a nivel matraz Erlenmeyer y en reactor de 40 L, respectivamente. Mediante el proceso también se logró la solubilización parcial de los glucanos susceptibles de extracción, así como del almidón residual presente en la cascarilla, etapa que valoriza una de las fracciones más representativas de la cascarilla de cebada como lo es la proteína en el contexto de una biorrefinería.

El proceso de desproteización y eliminación de almidón previo al pre-tratamiento permitió mejorar la transferencia de calor y masa en el SE, con lo cual se pudo incrementar el rendimiento de extracción de la xilosa en el líquido hasta un 49,8% a las condiciones de 170°C por 30 min.

Se encontró y se validó estadísticamente el punto óptimo de recuperación de xilosa en las condiciones evaluadas (temperatura de 160 a 180°C y tiempos de 15 a 30 min) en un punto de 173,5°C y 15,5 minutos de pre-tratamiento con una deseabilidad de 0,92. Este punto permitió maximizar la recuperación de xilosa y la obtención de la mayor concentración de este azúcar en el líquido.

Una de las principales ventajas de la tecnología del SE sobre la recuperación de los azúcares hemicelulósicos provenientes de la cascarilla de cebada desproteizada correspondió a la liberación de aproximadamente el 90% de la arabinosa de la estructura de los AX como azúcar neutro, lo cual implica que puede prescindirse de agregar cantidades importantes de las actividades enzimáticas tipo α -L-arabinofuranosidasas, lo cual desde el punto de vista técnico y económico sería una ventaja muy importante en proceso.

Se logró hidrolizar enzimáticamente el líquido concentrado 5,5 veces hasta un 78-86% de xilosa, con ayuda de siete enzimas comerciales puras con el siguiente porcentaje de combinación: 16% de endo-1,4- β -D-xilanasas (GH10), 4% de endo-1,4- β -D-xilanasas (GH11), 70% de β -xilosidasas (GH43), 2,5% de α -L-arabinofuranosidasas (GH51), 2,5% de α -D-glucuronidasas (GH67), 2,5% de acetil xilano estearasa (CE1) y 2,5% de feruloil estearasa (CE6) a una dosis de 0,6 mg de mezcla de enzimas-proteína/g de AX potencial a 40°C por 24 horas.

Se demostró la importancia de las actividades enzimáticas estearasas: acetil xilano y feruloil estearasas en la hidrólisis de los AX extraídos en el líquido de pre-tratamiento de la cascarilla de cebada con la tecnología de SE.

Los cocteles enzimáticos que involucraron las enzimas Ultraflo L, Celluclast 1.5 L, Viscozyme L y sus combinaciones fueron muy efectivas en hidrolizar la glucosa del líquido del SE, obteniéndose rendimientos cercanos al 100% en 48h de reacción.

Se propusieron alternativas de HE del líquido concentrado 5,5 veces con cocteles enzimáticos comerciales, donde se destacaron los resultados obtenidos para la enzima Cellic™ Ctec I suplementada con β -xilosidasa como el mejor cóctel enzimático capaz de liberar una cantidad equivalente de xilosa en comparación con las enzimas puras, hasta 80% de xilosa en 72 horas de reacción.

Los WIS obtenidos del pre-tratamiento del SE con la cascarilla de cebada desproteinizada fueron susceptibles de hidrolizarse enzimáticamente con ayuda de la enzima Cellic™ Ctec II, obteniéndose mayores rendimientos para la glucosa liberada (59,7-77,8%) respecto a la xilosa (35-45%), lo cual valoriza otra de las corrientes laterales generadas en el proceso planteado, dentro del concepto de una biorrefinería.

El ajuste del pH a 5,5 tiene un efecto significativo en la tolerancia de los ácidos alifáticos sobre la fermentación del hidrolizado del SE hasta xilitol por acción de la cepa *Candida guilliermondii* FTI 20037, a nivel matraz Erlenmeyer los mejores resultados arrojaron a este valor de pH un rendimiento $Y_{P/S}$ de 0,54 g/g y una productividad de 0,24 g/L/h.

El ajuste del k_{La} a un valor de $15h^{-1}$ sobre el hidrolizado real y concentrado 5,5 veces que se obtuvo a las mejores condiciones del SE (173°C por 15,5 min) e hidrolizado por acción de la mezcla Cellic™ Ctec I suplementado con β -xilosidasa, permitió obtener una concentración máxima de 37,16 g/L de xilitol con un rendimiento de 0,76 g/g y una productividad de 0,29 g/L/h.

Se realizó y validó experimentalmente la segunda opción de proceso planteada para la producción de xilitol empleando cascarilla de cebada sometida al pre-tratamiento de SE, en el contexto de una biorrefinería, donde adicionalmente se generaron corrientes laterales de péptidos, oligopéptidos, aminoácidos y WIS susceptibles de futuras investigaciones, para en conjunto evaluar la viabilidad del proceso a nivel económico.

4.5 Recomendaciones

Realizar un estudio más detallado de las mejores condiciones de desproteinización enzimática (pH, actividad, dosificación, etapas de separación) de la cascarilla de cebada previo al sometimiento del SE, inclusive evaluar la necesidad de realizar la etapa simultánea o no de eliminación de almidón.

Realizar un estudio más detallado de otras condiciones de temperatura, tiempo y catalizador en el SE sobre la cascarilla de cebada una vez esta se ha desproteinizado.

Evaluar métodos para retirar las capas de cutina de la cascarilla de cebada, para verificar si esto también mejora la transferencia de calor y masa en el SE.

Realizar un estudio más detallado de la estructura química de los AX extraídos con el pre-tratamiento del SE para no solamente identificar el grado de polimerización de los oligómeros solubles sino de los tipos de enlaces químicos aun presentes en la estructura.

Realizar ensayos más exhaustivos de la HE de los AX extraídos y concentrados en el líquido, respecto a la dosificación de las enzimas comerciales puras y de los cocteles enzimáticos disponibles.

Podría suplementarse los cocteles enzimáticos comerciales, así como la Cellic™ Ctec I con otras actividades enzimáticas como las esterasas y podría evaluarse también otros niveles de suplementación de la β -xilosidasa.

Considerar otro método de concentración del líquido de pre-tratamiento, menos intensivo-energéticamente para favorecer el incremento de la xilosa (incluso para obtener valores superiores a 80 g/L) en el hidrolizado y así favorecer la producción de xilitol.

De ser posible para la cepa evaluada incrementar más el valor del pH en la fermentación para evaluar la tolerancia de este microorganismo al ácido acético presente en el hidrolizado.

Realizar una etapa previa de adaptación de la levadura a los compuestos tóxicos generados y concentrados en el hidrolizado del SE y/o preparar el inóculo en el mismo medio tóxico.

Realizar más ensayos de fermentación, evaluando valores diferentes de k_La , incluso a diferentes concentraciones de inóculos.

Evaluar una cepa que no produzca arabitol, ya que la separación posterior en proceso de xilitol y arabitol es compleja.

5. Capítulo 5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

Se evaluó experimentalmente la producción de xilitol a partir de la cascarilla de cebada residual del proceso cervecero mediante el diseño de dos procesos que involucraron una etapa de pre-tratamiento fisicoquímico (alcalino y de explosión con vapor) seguido de dos etapas biotecnológicas (hidrólisis enzimática y fermentación).

Se extrajo la mayor proporción de la fracción de hemicelulosa (tipo arabinoxilanos) en el líquido de pre-tratamiento mediante el pre-tratamiento alcalino o de explosión con vapor, para posteriormente hidrolizar enzimáticamente esta fracción con ayuda de seis o incluso siete enzimas diferentes, para obtener el mayor grado de rendimiento de xilosa y así finalmente evaluar la fermentación de estos hidrolizados concentrados hasta xilitol, teniendo en cuenta el parámetro k_{La} .

Dentro de las dos alternativas de diseño se redujo o se integró la etapa de detoxificación en el proceso, al 1) eliminarse principalmente los compuestos fenólicos y el ácido acético generados en el pre-tratamiento alcalino mediante la etapa de precipitación etanólica previa a la hidrólisis enzimática de los AX y 2) al integrarse la etapa de concentración del líquido de pre-tratamiento previa a la hidrólisis enzimática logrando la disminución principalmente del furfural producido en el pre-tratamiento de SE.

Los dos hidrolizados obtenidos se fermentaron hasta xilitol, ajustándose el parámetro de escalamiento k_{La} a $15h^{-1}$, obteniéndose 58,85 g/L de xilitol en 70 horas, con un rendimiento $Y_{P/S}$ de 0,73 g/g y una Q_P 1,14 g/L/h para la primera opción de proceso y 37,16 g/L de xilitol

con un rendimiento de 0,76 g/g y una productividad de 0,29 g/L/h para la segunda opción de proceso.

- Los principales logros obtenidos en el primer diseño de proceso (pre-tratamiento alcalino) fueron:

Se desarrolló un proceso que involucró la extracción y pre-tratamiento alcalino de la fracción de hemicelulosa de la cascarilla de cebada, realizando un estudio cinético en cuatro condiciones de operación: (1) tratamiento severo nivel bajo (2) tratamiento severo nivel alto (3) tratamiento moderado nivel bajo y (4) tratamiento moderado nivel bajo.

Se estudiaron las variables: temperatura, concentración de NaOH, carga, velocidad de agitación y tiempo, dentro de los cuatro ensayos de pre-tratamiento alcalino, realizándose un análisis estadístico de medidas repetidas con ANOVA, donde se lograron escoger los máximos tiempos de extracción de la fracción de AX en el líquido de pre-tratamiento.

Se ajustó la cinética de reacción del modelo de Saeman a los cuatro pre-tratamientos evaluados y se logró ajustar la ecuación de Arrhenius a tres de las cuatro temperaturas evaluadas.

Se determinó el efecto del pre-tratamiento sobre la deslignificación, extracción de las proteínas y solubilización de la fracción de hemicelulosa, caracterizando la fracción líquida en cuanto a su contenido de azúcares, ácido acético y compuestos furanos y fenólicos extraídos. Los WIS se caracterizaron en cuanto a su contenido de proteína y composición estructural. Incluso, se realizó un análisis de covarianza para evaluar la dependencia de la composición inicial de la biomasa con la composición después de realizado el pre-tratamiento.

Se establecieron las mejores condiciones de proceso que permitieron hidrolizar los AX extraídos y separados de la fracción líquida mediante la sinergia de seis enzimas comerciales puras tipo: endo-1,4- β -xilanasas de la familia GH10 y GH11, α -L-arabinofuranosidasas de la familia GH43 y GH51, β -xilosidasa y α -glucuronidasa a concentraciones de 1 a 5 g/L por 48 horas a 40°C.

Se obtuvieron tres corrientes de proceso con un alto perfil de valorización en el contexto de una biorrefinería: (1) WIS después del pre-tratamiento, concentrados en celulosa y

susceptibles de hidrólisis enzimática, (2) precipitado rico en proteínas, péptidos y oligopéptidos y (3) sobrenadante alcohólico rico en compuestos fenólicos y ácido acético.

- Para el segundo diseño propuesto (pre-tratamiento de explosión con vapor) se encontró principalmente que:

El pre-tratamiento de explosión con vapor no es efectivo en la liberación de proteínas. Estas crean un efecto barrera sobre los fenómenos de transferencia de masa y calor del vapor hacia las fibras de la cascarilla de cebada, por esto es necesario realizar una etapa de desproteinización previo el pre-tratamiento de SE para incrementar la velocidad de los fenómenos de transferencia.

Una vez desproteinizada la cascarilla de cebada, el pre-tratamiento de explosión con vapor es efectivo para extraer aproximadamente el 50% de los arabinoxilanos previa impregnación del material con ácido, despolimerizando los xilo-oligosacáridos extraídos. Esto permitió liberar un buen porcentaje de arabinosa y en menor medida de xilosa, como azúcares neutros. Los WIS a su vez se concentraron en principalmente en celulosa y lignina.

Se establecieron las mejores condiciones de hidrólisis enzimática que permitieron obtener rendimientos superiores a 80% de liberación de xilosa del líquido de pre-tratamiento concentrado 5,5 veces mediante la sinergia de siete enzimas comerciales puras que comprendieron: endo-1,4- β -xilanasas de la familia GH10 y GH11, α -L-arabinofuranosidasa GH51, β -xilosidasa, α -glucuronidasa, acetil xilano y feruloil estearasa. Incluso se presentó una segunda opción de hidrólisis enzimática con la mezcla de la enzima Cellic™ Cetec I suplementada con β -xilosidasa.

Para la hidrólisis enzimática del pre-tratamiento de explosión con vapor se demostró que la hidrólisis de la arabinosa no fue tan importante como el rompimiento de los enlaces preservados tipo éster para incrementar el rendimiento de liberación de xilosa.

Se obtuvieron dos corrientes laterales de proceso, con un alto perfil de valorización en el contexto de una biorrefinería: (1) hidrolizado rico en proteínas, péptidos, oligopéptidos y aminoácidos después de la etapa de desproteinización con ayuda de enzimas comerciales y (2) WIS con buena digestibilidad enzimática.

En cuanto a la comparación de los dos procesos diseñados, se podría concluir principalmente que:

El mayor rendimiento de extracción de xilosa se obtuvo para el pre-tratamiento con NaOH (63,92%) a 40°C, 12 horas de reacción y una solución de NaOH 4 M. Las condiciones de pre-tratamiento con el SE que produjeron el mayor rendimiento (49,80%) fueron de 170°C por 15 min previa impregnación de la cascarilla de cebada desproteinizada, con ácido al 0,5% p/v.

El pre-tratamiento de SE logra hidrolizar 90% de la arabinosa y 30% de xilosa como azúcares libres neutros de los AX extraídos de la cascarilla de cebada en comparación con el pre-tratamiento alcalino que no libera ningún azúcar neutro.

Los AX extraídos por el pre-tratamiento alcalino y de SE presentaron diferencias estructurales que fueron marcadas directamente por el tipo y porcentaje de combinación de las enzimas puras que debían adicionarse en la etapa de hidrólisis enzimática.

El SE logró mayores rendimientos de hidrólisis enzimática para el líquido del pre-tratamiento tanto con enzimas comerciales puras como con cocteles enzimáticos comerciales en comparación con los AX extraídos y separados del líquido de pre-tratamiento alcalino.

Para el pre-tratamiento de SE no es necesario secar ni moler la cascarilla de cebada previo al pre-tratamiento, en el reactor de SE se puede cargar una mayor cantidad de cascarilla de cebada en comparación con los ensayos realizados para el pre-tratamiento alcalino.

De manera general el tratamiento de las corrientes aguas abajo del pre-tratamiento alcalino es más complicado, mientras que en el pre-tratamiento por SE deben realizarse etapas aguas arriba del proceso, como la desproteinización de la biomasa.

En términos generales las dos opciones de proceso diseñadas en esta investigación valorizaron la cascarilla de cebada, co-producto del proceso cervecero para obtener un producto de mayor valor agregado como el xilitol, ampliando opciones de aprovechamiento de este tipo de biomásas en el país, para posibles aplicaciones en el contexto de una biorrefinería.

5.2 Recomendaciones

Podría evaluarse en futuros proyectos relacionados con esta temática:

Reciclar el NaOH con dióxido de carbono hasta carbonato de sodio insoluble, para evitarse la alta formación de sal, si la solución alcalina se neutraliza con ácido.


Realizar un análisis de viabilidad económica de los procesos planteados para sopesar la influencia en la facilidad de operación, el costo de los procesos posteriores y la compensación entre varios costos, incluidos los precios operativos, de capital y de biomasa.

Realizar un estudio en el que se contemple la valorización de la fracción de proteína o de los hidrolizados obtenidos en esta investigación, ya que presentan alto interés en el campo científico e industrial, con aplicaciones inclusive en el área de alimentación humana.

Evaluar otro tipo de condiciones de hidrólisis y fermentación, por ejemplo, inmovilizando las enzimas y/o el microorganismo.

Evaluar la separación de la arabinosa producida en el pre-tratamiento o después de la hidrólisis enzimática.

A. Anexo: Fichas técnicas enzimas puras



endo-1,4- β -D-XYLANASE from *Neocallimastix patriciarum* (Lot 91001d)

Recombinant
E-XYLNP
 Catalytic domain of XynIIA from *Neocallimastix patriciarum*
 (EC 3.2.1.8) endo-1,4- β -D-xylanase
 CAZy: GH Family 11

04/16

PROPERTIES

- ELECTROPHORETIC PURITY:**
 - Single band on SDS-gel electrophoresis (MW ~ 25,800)
 - Single major band on isoelectric focusing (pI ~ 6.5)
- SPECIFIC ACTIVITY:**
1094 U/mg protein (on wheat arabinoxylan) at pH 6.0 and 40°C
 ~ 1497 U/mg protein (on wheat arabinoxylan) at pH 6.0 and 50°C

One Unit of xylanase activity is defined as the amount of enzyme required to release one μ mole of xylose reducing-sugar equivalents per minute from wheat arabinoxylan (5 mg/mL) in sodium phosphate buffer (100 mM) pH 6.0.
- RELATIVE RATES OF HYDROLYSIS OF SUBSTRATES:**

Substrate	%
Wheat Arabinoxylan	100
CM-Cellulose 4M	< 0.001
Barley β -Glucan	< 0.001

Action on polysaccharide substrates was determined at a final substrate concentration of 5 mg/mL in sodium phosphate buffer (100 mM), pH 6.0 at 40°C.
- PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES:**

pH Optima: 6.0 - 6.5
 pH Stability: 3.0 - 9.0 (> 75% control activity after 24 hours at 4°C)
 Temperature Optima: 50°C (10 min. reaction)
 Temperature Stability: up to 50°C (> 90% control activity after 15 min.)
- STORAGE CONDITIONS:**
 The enzyme is supplied as an ammonium sulphate suspension in 0.02% (w/v) sodium azide and should be stored at 4°C. For assay, this enzyme should be diluted in sodium phosphate buffer (100 mM), pH 6.0 containing 0.5 mg/mL BSA. **Swirl to mix the enzyme immediately prior to use.**


endo-1,4- β -D-XYLANASE from *Cellvibrio japonicus* (Lot 90601c)
Recombinant
E-XYNACJ

11/13

(EC 3.2.1.8) endo-1,4- β -D-xylanase

CAZy: GH Family 10

PROPERTIES
1. ELECTROPHORETIC PURITY:

- Single band on SDS-gel electrophoresis (MW ~ 39,000)
- Single major band on isoelectric focusing (pI ~ 5.4)

2. SPECIFIC ACTIVITY:

38 U/mg protein (on wheat arabinoxylan) at pH 5.0 and 40°C;
62 U/mg protein (on wheat arabinoxylan) at pH 5.0 and 60°C.

One Unit of xylanase activity is defined as the amount of enzyme required to release one μ mole of xylose reducing-sugar equivalents per minute from wheat arabinoxylan (5 mg/mL) in sodium acetate buffer (100 mM) pH 5.0.

3. RELATIVE RATES OF HYDROLYSIS OF SUBSTRATES:

Substrate	%
Wheat Arabinoxylan	100
CM-Cellulose 4M	< 0.03
Barley β -Glucan	< 0.001

Action on polysaccharide substrates was determined at a final substrate concentration of 5 mg/mL in sodium acetate buffer (100 mM), pH 5.0 at 40°C.

4. PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES:

pH Optima: 5.0
 pH Stability: 4.0 - 10.0 (> 75% control activity after 24 hours at 4°C)
 Temperature Optima: 60°C (10 min. reaction)
 Temperature Stability: up to 40°C (> 90% control activity after 15 min.)

5. STORAGE CONDITIONS:

The enzyme is supplied as an ammonium sulphate suspension in 0.02% (w/v) sodium azide and should be stored at 4°C. For assay, this enzyme should be diluted in sodium acetate buffer (100 mM), pH 5.0 containing 0.5 mg/mL BSA. **Swirl to mix the enzyme immediately prior to use.**



α -L-ARABINOFURANOSIDASE from *Bifidobacterium* sp. (Lot 91201c)

Recombinant

E-AFAM2

03/16

(3.2.1.55) α -L-arabinofuranoside arabinofuranohydrolase

CAZy: GH Family 43

PROPERTIES

1. ELECTROPHORETIC PURITY:

- Single band on SDS-gel electrophoresis (MW ~ 59,404)
- Broad diffuse band on isoelectric focusing (pI ~ 4.6)

2. SPECIFIC ACTIVITY AND LEVEL OF OTHER ACTIVITIES:

102 U/mg protein (on wheat arabinoxylan) at pH 6.0 and 40°C.

***One Unit** of α -L-arabinofuranosidase activity is defined as the amount of enzyme required to release one μ mole of arabinose per minute from wheat arabinoxylan (10 mg/mL) in sodium phosphate buffer (100 mM) pH 6.0.

3. RELATIVE RATES OF HYDROLYSIS OF SUBSTRATES:

Substrate	%
Wheat Arabinoxylan (7 mg/mL; pH 6; 40°C)	100
Xylanase-treated Wheat Arabinoxylan (7 mg/mL; pH 6; 40°C)	90.4
Sugar Beet Arabinan (7 mg/mL; pH 4; 40°C)	4.0
p-Nitrophenyl- α -arabinofuranoside (2.5 mM; pH 4; 40°C)	0.095

4. OTHER ACTIVITIES (as a percentage of α -L-arabinofuranosidase activity):

Enzyme Activity	%
endo- α -L-Arabinanase	< 0.0001
endo- β -D-Xylanase	< 0.0001

Protein was determined using the Folin/Lowry procedure with BSA as standard.

5. STABILITY:

Stable at room temperature for > 6 h at pH 6.0. Stable for 2 hours at pH 6.0 and temperatures up to 50°C. The enzyme is supplied as an ammonium sulphate suspension in 0.02% (w/v) sodium azide and should be stored at 4°C. Stable for > 2 years at 4°C. On dissolution in buffer, store at -20°C. Stable to repeated freeze-thaw cycles.

6. REFERENCES:

- Van Laere, K.M.J., Beldman, G. & Voragen, A.G.J. (1997) A new arabinofuranohydrolase from *Bifidobacterium adolescentis* able to remove arabinofuranosyl residues from double substituted xylose units in arabinoxylan. *Appl Microbiol. Biotech.* **47**: 231-235.
- Van den Broek, L.A.M., Lloyd, R.M., Beldman, G., Verdoes, J.C., McCleary, B.V. & Voragen, A.G.J. (2005) Cloning and characterization of arabinoxylan arabinohydrolase D-3 (AXH-D3) from *Bifidobacterium adolescentis* DSM20083. *Appl Microbiol. Biotech.* **67**: 641-647.

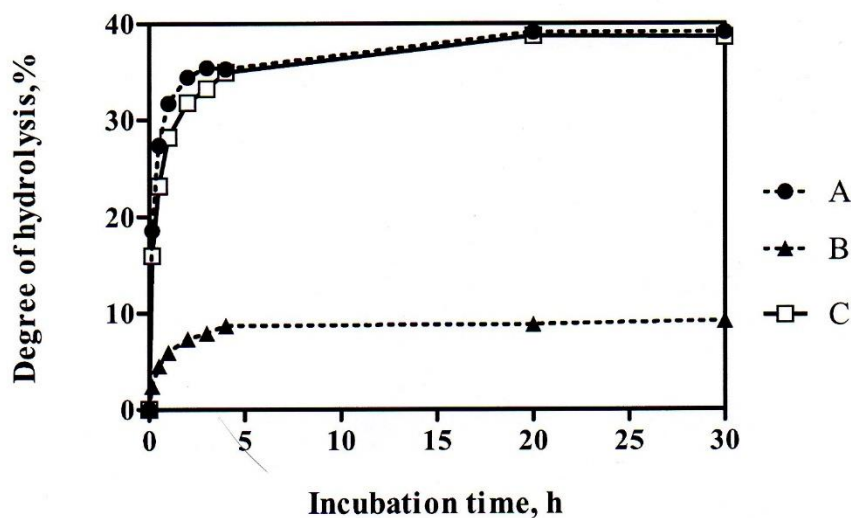


Figure 1. Hydrolysis of xylanase degraded wheat arabinoxylan by *A. niger* and *B. adolescentis* α -L-arabinofuranosidase.

Xylanase degraded wheat arabinoxylan (5 mL, 2 mg/mL) was incubated with A. *A. niger* α -L-arabinofuranosidase (500 U on *p*-NP- α -L arabinofuranoside) in 100 mM sodium acetate buffer (pH 4.5), or B. *B. adolescentis* α -L-arabinofuranosidase (7 U on wheat arabinoxylan) in 100 mM sodium maleate buffer (pH 6.5), or C. *A. niger* α -L-arabinofuranosidase (500 U on *p*-NP- α -L arabinofuranoside) plus *B. adolescentis* α -L-arabino-furanosidase (7 U on wheat arabinoxylan) in 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.0). Aliquots (50 mL) were removed at various time intervals, inactivated by incubation at 100°C for 2 min, and analysed for released L-arabinose with β -galactose dehydrogenase. Degree of hydrolysis was calculated as L-arabinose released as a percentage of total carbohydrate determined with the phenol-sulphuric acid procedure.

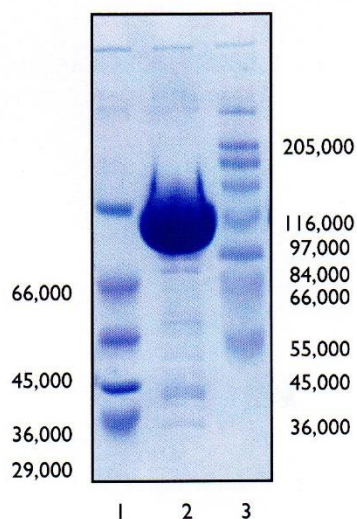


Figure 2. SDS-PAGE analysis of α -L-arabinofuranosidase (*Bifidobacter* sp.)

Electrophoresis was performed using a 10% acrylamide gel.

Lane 1, low molecular weight markers (Sigma cat. no. M-3918); lane 2, 5 μ g *B. adolescentis* α -L-arabinofuranosidase; lane 3, high molecular weight markers (Sigma cat. no. M-3788).



α -L-ARABINOFURANOSIDASE from *A. niger* (Lot 140301a)

E-AFASE

04/15

(EC 3.2.1.55) α -L-arabinofuranoside arabinofuranohydrolase
CAZy: GH Family 51

PROPERTIES

1. ELECTROPHORETIC PURITY:

- Single major band on SDS-gel electrophoresis (MW = 62,000)
- Single major band on isoelectric focusing (pI < 3.0)

2. SPECIFIC ACTIVITY:

Substrate	Specific Activity (U/mg protein)
<i>p</i> -Nitrophenyl- α -arabinofuranoside (5 mM, pH 4, 40°C)	32.0
1,5- α -L-Arabinotriitol (5 mM, pH 4, 40°C)	7.1
Sugar-beet arabinan (5 mg/mL, pH 4, 40°C)	12.6
Wheat flour Arabinoxylan (5 mg/mL, pH 4, 40°C)	0.7
Debranched Sugar-beet arabinan (5 mg/mL, pH 4, 40°C)	0.4

Protein was determined with the Bio Rad Dye Binding procedure (Bradford) with BSA as standard.

3. CONTAMINATION WITH OTHER ACTIVITIES (%):

<i>endo</i> -Arabinanase	< 0.001
β -Xylanase	< 0.01

4. STABILITY:

(a) pH Stability: Stable at room temperature for 20 hr at pH 4.0 to 8.0.

(b) Temperature Stability: Stable for 20 hr at pH 4.0 and temperatures up to 50°C.

The enzyme is supplied in 3.2 M ammonium sulphate containing 0.02% sodium azide and should be stored at 4°C. On dissolution in buffer, it should be stored at -20°C.

It is stable to repeated freeze/thaw cycles. On lyophilisation in the absence of salt, it can not be completely redissolved.



β -D-XYLOSIDASE from *S. ruminantium* (Lot 100301c)

Recombinant

E-BXSR-3KU

09/16

(EC 3.2.1.37) exo-1,4- β -D-xylosidase; 1,4- β -D-xylan xylohydrolase
CAZy: GH Family 43

PROPERTIES:

1. ELECTROPHORETIC PURITY:

- Single band on SDS-gel electrophoresis (MW ~ 61,900)
- Single major band on isoelectric focusing (pI ~ 5.4)

2. SPECIFIC ACTIVITY:

118 U/mg protein at pH 5.3 and 40°C on *p*-NP- β -D-xyloside
~ 300 U/mg protein at pH 5.3 and 40°C on xylobiose

One Unit of β -xylosidase activity is defined as the amount of enzyme required to release one μ mole of *p*-nitrophenol (*p*-NP) per minute from *p*-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside (5 mM) in sodium succinate buffer (50 mM), pH 5.3 at 40°C.

3. OTHER ACTIVITIES (as a percentage of β -xylosidase activity):

Enzyme Measured	Substrate	%
β -D-Xylosidase	<i>p</i> -NP- β -D-xyloside	100
α -L-Arabinofuranosidase	<i>p</i> -NP- α -L-arabinofuranoside	~ 7.0
β -L-Arabinosidase	<i>p</i> -NP- β -L-arabinopyranoside	< 0.01
α -D-Glucosidase	<i>p</i> -NP- α -D-glucopyranoside	< 0.01
β -D-Glucosidase	<i>p</i> -NP- β -D-glucopyranoside	< 0.01
β -D-Glucuronidase	<i>p</i> -NP- β -D-glucuronide	< 0.01
α -D-Xylosidase	<i>p</i> -NP- α -D-xyloside	< 0.01
α -D-Galactosidase	<i>p</i> -NP- α -D-galactopyranoside	< 0.01
β -D-Galactosidase	<i>p</i> -NP- β -D-galactopyranoside	< 0.01
α -D-Mannosidase	<i>p</i> -NP- α -D-mannopyranoside	< 0.01
β -D-Mannosidase	<i>p</i> -NP- β -D-mannopyranoside	< 0.01

Action on *p*-NP-substrates was determined at a final substrate concentration of 5 mM in sodium succinate (50 mM), pH 5.3 at 40°C.

4. RELATIVE RATES OF HYDROLYSIS OF SUBSTRATES:

Substrate	Relative Hydrolysis Rate
Xylobiose	100*
Xylotriose	82
Xyloetraose	65
Xylopentaose	46

Action on oligosaccharide and polysaccharide substrates was determined at a final substrate concentration of 5 mM and 10 mg/mL, respectively, in sodium succinate buffer (50 mM), pH 5.3 at 40°C.

* Hydrolysis of xylobiose releases two xylose molecules. This is accounted for in the calculation of the Relative Hydrolysis Rate.

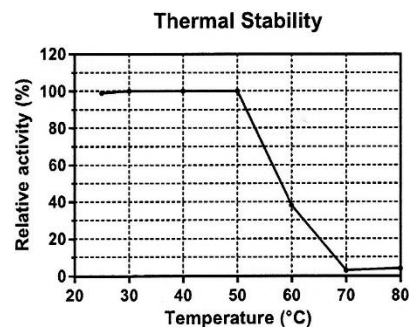
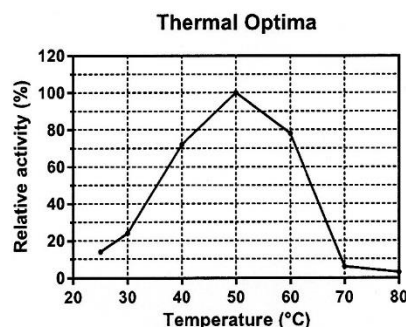
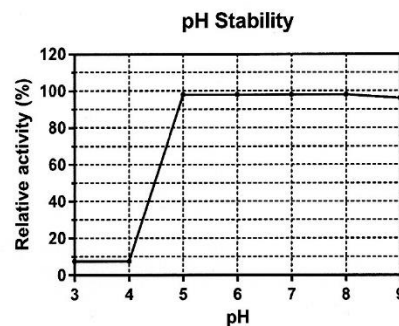
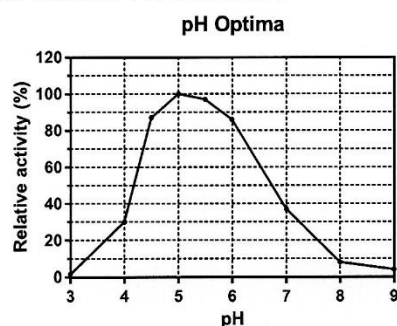
5. PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES

pH Optima: 5.0
 pH Stability: 5.0-9.0 (> 75% control activity after 24 h at 4°C)
 Temperature Optima: 50°C (10 min reaction)
 Temperature Stability: up to 50°C (diluted with 1 mg/mL BSA)

6. STORAGE CONDITIONS

The enzyme is supplied as an ammonium sulphate suspension in 0.02% (w/v) sodium azide and should be stored at 4°C. For assay, this enzyme should be diluted in sodium succinate buffer (50 mM), pH 5.3 containing 1 mg/mL BSA. **Swirl to mix the enzyme immediately prior to use.**

7. EXPERIMENTAL DATA



8. REFERENCES:

- Jordan, D. B., Li, X.-L., Dunlap, C. A., Whitehead, T. R. & Cotta, M. A. (2007). β -D-Xylosidase from *Selenomonas ruminantium* of Glycoside Hydrolase Family 43. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **137-140**, 93-104.
- Jordan, D. B. & Li, X.-L. (2007). Variation in relative substrate specificity of bifunctional β -D-xylosidase/ α -L-arabinofuranosidase by single-site mutations: Roles of substrate distortion and recognition. *Biochimica et Biophysica Acta* **1774**, 1192-1198.
- Jordan, D. B., Li, X.-L., Dunlap, C. A., Whitehead, T. R. & Cotta, M. A. (2007). Structure-function relationships of a catalytically efficient β -D-xylosidase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **141**, 51-76.
- Jordan, D. B. (2008). β -D-Xylosidase from *Selenomonas ruminantium*: Catalyzed Reactions with Natural and Artificial Substrates. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **146**, 137-149.

 **α -D-GLUCURONIDASE from *Geobacillus stearothermophilus* (Lot 150902a)****Recombinant - Thermostable****E-AGUBS**

03/17

Fusion protein of α -D-glucuronidase
(EC 3.2.1.139) alpha-D-glucosiduronate glucuronohydrolase
CAZy: GH Family 67

PROPERTIES**1. ELECTROPHORETIC PURITY:**

- Single band on SDS-gel electrophoresis (MW ~ 93,200)
- Broad diffuse band on isoelectric focusing (pI ~ 5.4)

2. SPECIFIC ACTIVITY AND LEVEL OF OTHER ACTIVITIES:**18 U/mg protein (on Aldotriouronic acid) at pH 7.0 and 70°C****13 U/mg protein (on Aldotriouronic acid) at pH 7.0 and 40°C**

One Unit of α -D-glucuronidase activity is defined as the amount of enzyme required to release one μ mole of α -D-glucuronic acid per minute from aldotriouronic acid in MOPS buffer (100 mM) pH 7.0 and 70°C. The assay was performed using the α -D-Glucuronidase Assay Kit from Megazyme (**Megazyme catalogue code: K-AGLUA**).

3. SPECIFICITY:

Hydrolysis of the α -1,2 glycosidic bond between D-glucuronic acid or its ether 4-O-methyl-D-glucuronic acid and D-xylose residues of xylo-oligosaccharides (aldo-uronic acids) from xylan.

4. PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES:

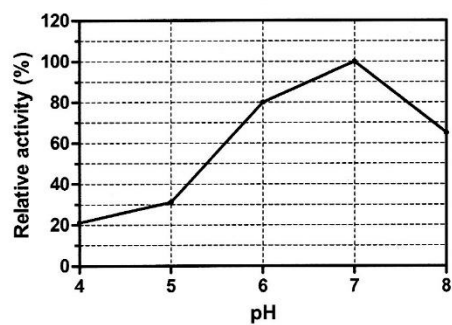
pH Optima: 7.0
pH Stability: 6.0 - 9.0 (> 75% control activity after 24 hours at 4°C)
Temperature Optima: 70°C (10 min. reaction)
Temperature Stability: up to 70°C (> 90% control activity after 15 min.)

5. STORAGE CONDITIONS:

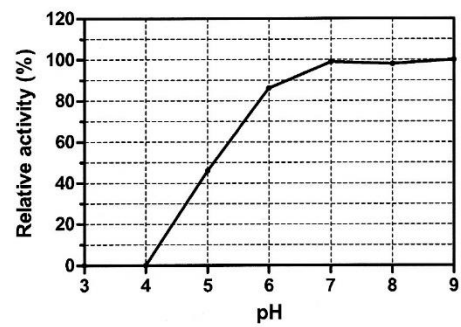
The enzyme is supplied in 50% glycerol containing 0.02 % (w/v) sodium azide and should be stored at -20°C. For assay, this enzyme should be diluted in MOPS buffer (100 mM), pH 7.0 containing 0.5 mg/mL BSA.

6. EXPERIMENTAL DATA

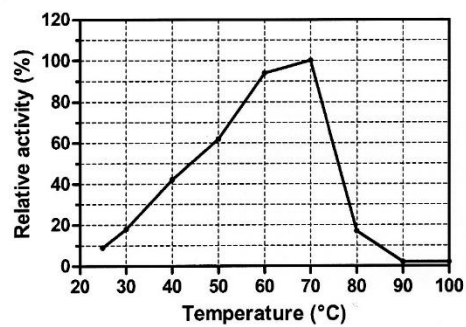
pH Optima



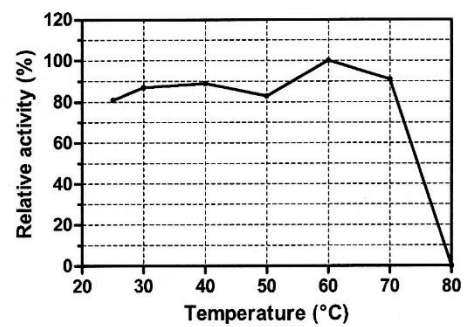
pH Stability



Thermal Optima



Thermal Stability



**FERULOYL ESTERASE from *Clostridium thermocellum* (Lot 100801f)**

Recombinant

E-FAEZCT

02/17

Feruloyl esterase domain of XynZ (Xyn10A) from *Clostridium thermocellum*
(EC 3.1.1.73) 4-hydroxy-3-methoxycinnamoyl-sugar hydrolase
CAZy Family CE1

PROPERTIES**1. ELECTROPHORETIC PURITY:**

- Single band on SDS-gel electrophoresis (MW ~ 29,000)
- Single major band on isoelectric focusing (pI ~ 6.8)

2. SPECIFIC ACTIVITY:

0.5 U/mg protein (on ethyl-ferulate) at pH 6.0 and 50°C.
~ 28 U/mg protein (on FAXX) at pH 6.0 and 60°C.*

One Unit of feruloyl esterase activity is defined as the amount of enzyme required to release one μ mole of ferulic acid from ethyl-ferulate per minute at pH 6.0 and 50°C under the following conditions:

MOPS buffer, pH 6.0

100 mM

Ethyl-ferulate

0.39 mM

3. PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES:

pH Optima: 4.0 - 7.0*
Temperature Optima: 50 - 60°C*
Temperature Stability: up to 70°C*

4. STORAGE CONDITIONS:

The enzyme is supplied as an ammonium sulphate suspension in 0.02% (w/v) sodium azide and should be stored at 4°C. For assay, this enzyme should be diluted in sodium phosphate buffer (100 mM), pH 6.0 containing 1.0 mg/mL BSA. **Swirl to mix the enzyme immediately prior to use.**

5. REFERENCES:

Blum, D.L., Kateava, I.A., Li, X.L, Chen, H. & Ljungdahl, L.G. (2000) Feruloyl Esterase Activity of the *Clostridium thermocellum* Cellulosome Can Be Attributed to Previously Unknown Domains of XynY and XynZ. *Journal of Bacteriology* **182**(5):1346-1351

* Literature values

**ACETYLXYLAN ESTERASE from *Orpinomyces* sp. (Lot 130201b)**

Recombinant

E-AXEAO-1KU

03/16

(EC 3.1.1.72) Acetylxylan esterase

CAZy: CE Family 6

PROPERTIES**1. ELECTROPHORETIC PURITY:**

- Single band on SDS-gel electrophoresis (MW ~ 34,000)
- Single major band on isoelectric focusing (pI ~ 5.6)

2. SPECIFIC ACTIVITY:**165 U/mg protein (on 4-nitrophenyl acetate) at pH 6.7 and 40°C.***1000 U // 1000 U/ml*

*One Unit of acetylxylan esterase activity is defined as the amount of enzyme required to release one μ mole of *p*-nitrophenol from 4-nitrophenyl acetate per minute at 40°C measured at 405 nm under the following assay conditions:

Sodium phosphate buffer, pH 6.7	20 mM
4-Nitrophenyl acetate (4-NPA)	0.5 mM

* Extinction coefficient (ϵ) of *p*-nitrophenol = $9100 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$

3. PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES:

pH Optima:	7.0**
pH Stability:	3.0 - 9.0 (> 75% control activity after 24 hours at 4°C)
Temperature Optima:	40°C (10 min. reaction)
Temperature Stability:	up to 50°C (> 90% control activity after 15 min.)

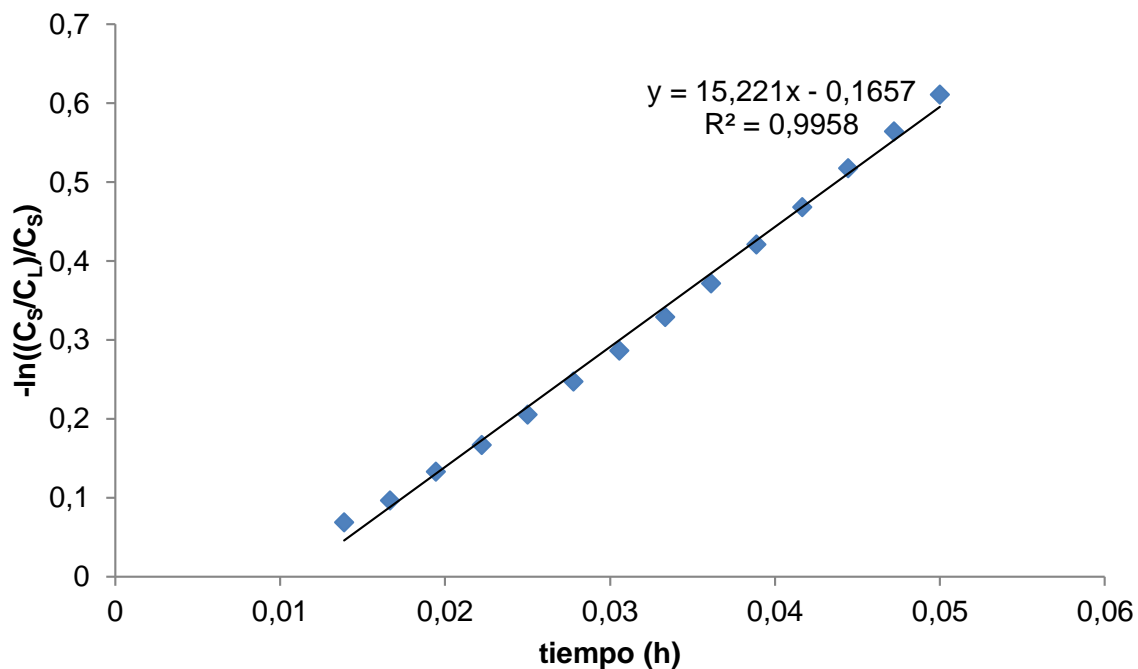
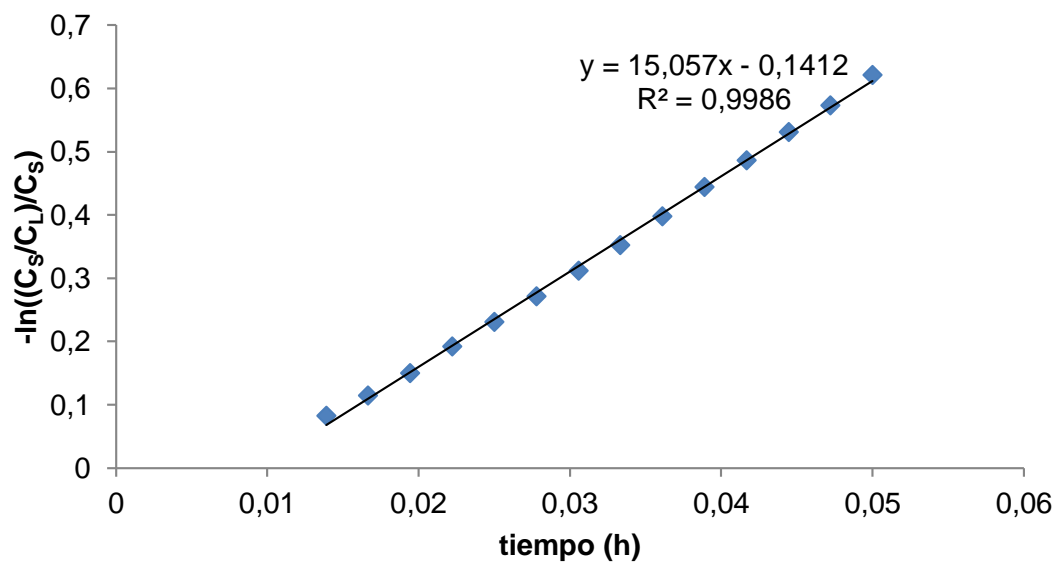
** The rate of non-enzymatic de-esterification of 4-nitrophenyl acetate increases with increasing pH

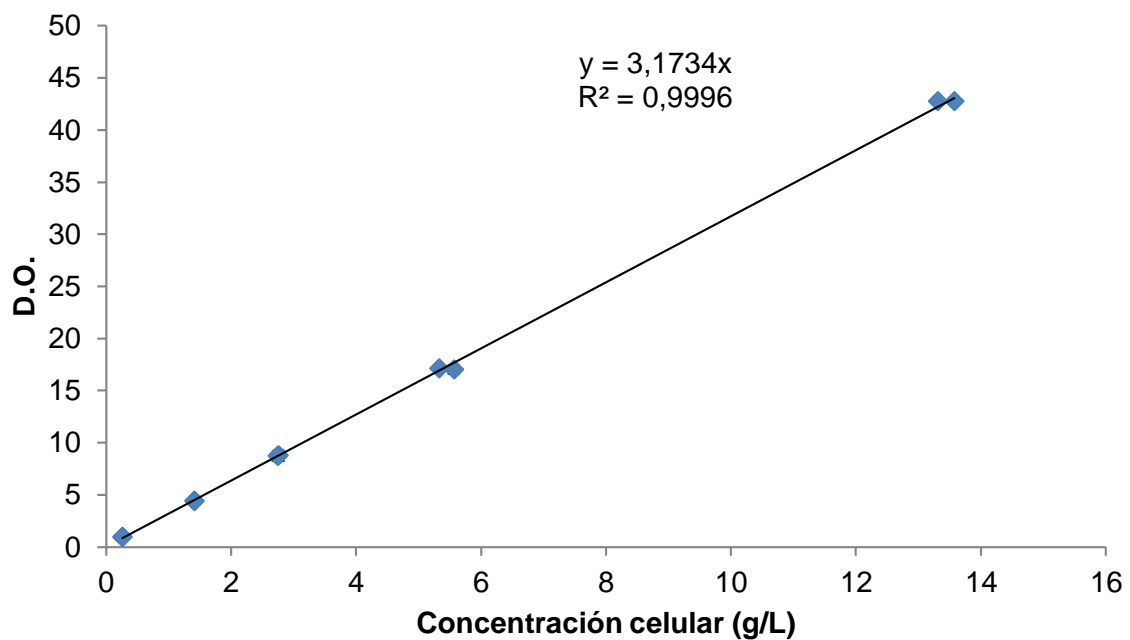
4. STORAGE CONDITIONS:

The enzyme is supplied as an ammonium sulphate suspension in 0.02% (w/v) sodium azide and should be stored at 4°C. For assay, this enzyme should be diluted in sodium phosphate buffer (100 mM), pH 6.7 containing 1.0 mg/mL BSA. **Swirl to mix the enzyme immediately prior to use.**

5. REFERENCES:

Blum, D.L., Li, X.L., Chen, H. & Ljungdahl, L.G. (1999) Characterization of an acetyl xylan esterase from the anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. strain PC-2. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(9):3990-5.

B. Anexo. Curvas típicas para la determinación de k_La **Figura B.1.** Determinación de k_La para el primer reactor a 300 rpm y 1,35 vvm**Figura B.2.** Determinación de k_La para el segundo reactor a 300 rpm y 1,35 vvm

C. Anexo. Curva de calibración para *C. guilliermondii*

D. Anexo. Análisis estadístico del modelo de medidas repetidas

Dependent Variable: YXil

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	35	27976.13032	799.31801	28.62	<.0001
Error	48	1340.46410	27.92634		
Corrected Total	83	29316.59441			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	YXil Mean
0.954276	17.62206	5.284537	29.98819

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Grado	1	23539.46882	23539.46882	842.91	<.0001
Nivel	1	315.28353	315.28353	11.29	0.0015
Grado*Nivel	1	518.88034	518.88034	18.58	<.0001
Reactor(Grado*Nivel)	8	403.97143	50.49643	1.81	0.0987
tiempo	6	820.53655	136.75609	4.90	0.0006
Grado*tiempo	6	1189.32268	198.22045	7.10	<.0001
Nivel*tiempo	6	262.82551	43.80425	1.57	0.1769
Grado*Nivel*tiempo	6	925.84145	154.30691	5.53	0.0002

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Grado	1	23079.23894	23079.23894	826.43	<.0001
Nivel	1	290.68182	290.68182	10.41	0.0023
Grado*Nivel	1	485.87095	485.87095	17.40	0.0001
Reactor(Grado*Nivel)	8	434.46893	54.30862	1.94	0.0746
tiempo	6	831.52941	138.58823	4.96	0.0005
Grado*tiempo	6	1125.46647	187.57774	6.72	<.0001
Nivel*tiempo	6	262.90425	43.81737	1.57	0.1767
Grado*Nivel*tiempo	6	925.84145	154.30691	5.53	0.0002

Tests of Hypotheses Using the Type I MS for Reactor(Grado*Nivel) as an Error Term

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Grado	1	23539.46882	23539.46882	466.16	<.0001
Nivel	1	315.28353	315.28353	6.24	0.0370
Grado*Nivel	1	518.88034	518.88034	10.28	0.0125

Dependent Variable: YAra

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	35	37130.16674	1060.86191	114.96	<.0001
Error	48	442.93492	9.22781		
Corrected Total	83	37573.10166			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	YAra Mean
0.988211	5.887694	3.037731	51.59459

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Grado	1	2327.02498	2327.02498	252.18	<.0001
Nivel	1	27025.07066	27025.07066	2928.65	<.0001
Grado*Nivel	1	6188.37896	6188.37896	670.62	<.0001
Reactor(Grado*Nivel)	8	313.58873	39.19859	4.25	0.0007
tiempo	6	755.90454	125.98409	13.65	<.0001
Grado*tiempo	6	176.42281	29.40380	3.19	0.0103
Nivel*tiempo	6	132.87728	22.14621	2.40	0.0415
Grado*Nivel*tiempo	6	210.89877	35.14979	3.81	0.0035

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Grado	1	2232.91621	2232.91621	241.98	<.0001
Nivel	1	26936.70802	26936.70802	2919.08	<.0001
Grado*Nivel	1	6006.44129	6006.44129	650.91	<.0001
Reactor(Grado*Nivel)	8	353.48882	44.18610	4.79	0.0002
tiempo	6	746.57874	124.42979	13.48	<.0001
Grado*tiempo	6	171.43347	28.57225	3.10	0.0121
Nivel*tiempo	6	133.89687	22.31615	2.42	0.0401
Grado*Nivel*tiempo	6	210.89877	35.14979	3.81	0.0035

Tests of Hypotheses Using the Type I MS for Reactor(Grado*Nivel) as an Error Term

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Grado	1	2327.02498	2327.02498	59.37	<.0001
Nivel	1	27025.07066	27025.07066	689.44	<.0001
Grado*Nivel	1	6188.37896	6188.37896	157.87	<.0001

Dependent Variable: YAX

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	35	20569.44120	587.69832	21.56	<.0001
Error	48	1308.45794	27.25954		
Corrected Total	83	21877.89914			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	YAX Mean
0.940193	14.24022	5.221067	36.66423

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Grado	1	14006.68052	14006.68052	513.83	<.0001
Nivel	1	1530.76804	1530.76804	56.16	<.0001
Grado*Nivel	1	1618.30407	1618.30407	59.37	<.0001
Reactor(Grado*Nivel)	8	754.76736	94.34592	3.46	0.0032
tiempo	6	735.17792	122.52965	4.49	0.0011
Grado*tiempo	6	816.71568	136.11928	4.99	0.0005
Nivel*tiempo	6	332.45181	55.40864	2.03	0.0794
Grado*Nivel*tiempo	6	774.57580	129.09597	4.74	0.0007

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Grado	1	13678.05422	13678.05422	501.77	<.0001
Nivel	1	1567.57211	1567.57211	57.51	<.0001
Grado*Nivel	1	1543.89586	1543.89586	56.64	<.0001
Reactor(Grado*Nivel)	8	796.04181	99.50523	3.65	0.0022
tiempo	6	747.36637	124.56106	4.57	0.0010
Grado*tiempo	6	784.22398	130.70400	4.79	0.0007
Nivel*tiempo	6	329.49344	54.91557	2.01	0.0819
Grado*Nivel*tiempo	6	774.57580	129.09597	4.74	0.0007

Tests of Hypotheses Using the Type I MS for Reactor(Grado*Nivel) as an Error Term

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Grado	1	14006.68052	14006.68052	148.46	<.0001
Nivel	1	1530.76804	1530.76804	16.23	0.0038
Grado*Nivel	1	1618.30407	1618.30407	17.15	0.0032

Dependent Variable: YGlc

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	35	1524.701985	43.562914	57.19	<.0001
Error	48	36.560112	0.761669		
Corrected Total	83	1561.262097			

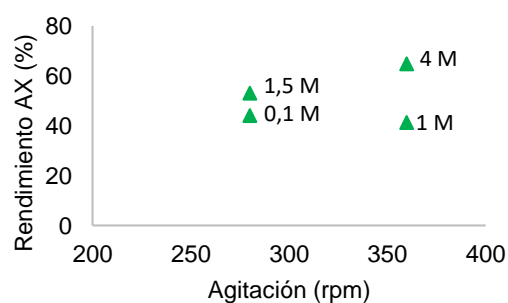
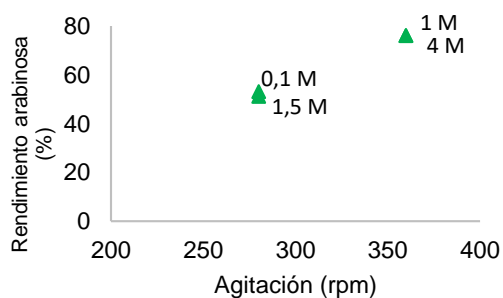
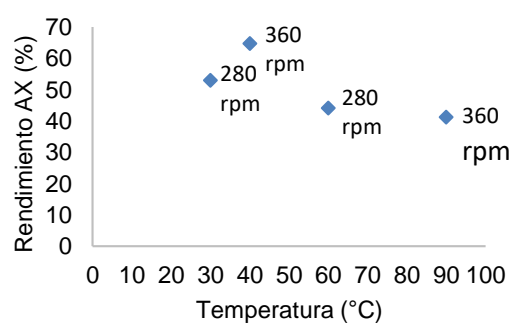
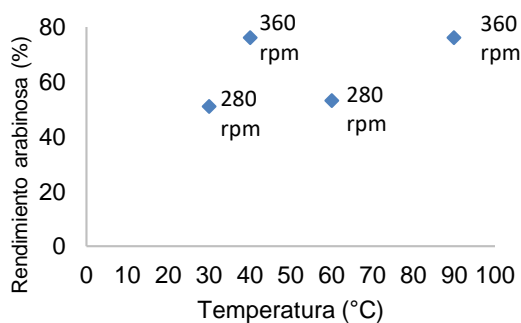
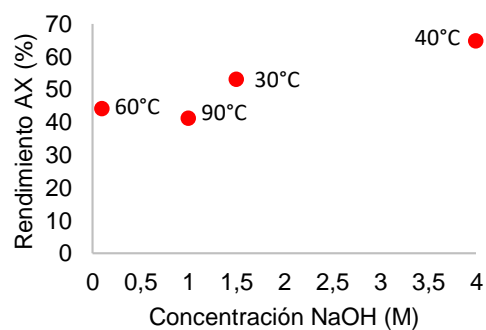
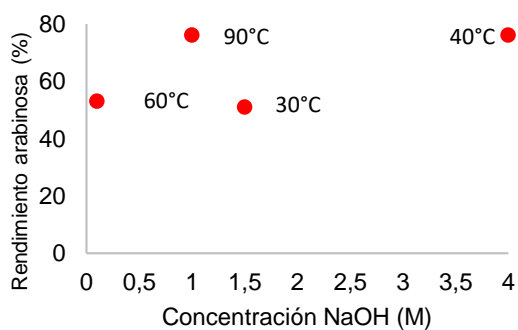
R-Square	Coeff Var	Root MSE	YGlc Mean
0.976583	15.29807	0.872737	5.704881

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Grado	1	222.483558	222.483558	292.10	<.0001
Nivel	1	1200.474834	1200.474834	1576.11	<.0001
Grado*Nivel	1	8.367027	8.367027	10.99	0.0018
Reactor(Grado*Nivel)	8	12.511635	1.563954	2.05	0.0596
tiempo	6	7.838701	1.306450	1.72	0.1378
Grado*tiempo	6	31.246038	5.207673	6.84	<.0001
Nivel*tiempo	6	23.467537	3.911256	5.14	0.0004
Grado*Nivel*tiempo	6	18.312656	3.052109	4.01	0.0025

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Grado	1	216.432590	216.432590	284.16	<.0001
Nivel	1	1178.358073	1178.358073	1547.07	<.0001
Grado*Nivel	1	7.613633	7.613633	10.00	0.0027
Reactor(Grado*Nivel)	8	13.659026	1.707378	2.24	0.0403
tiempo	6	8.373436	1.395573	1.83	0.1126
Grado*tiempo	6	30.943493	5.157249	6.77	<.0001
Nivel*tiempo	6	23.470597	3.911766	5.14	0.0004
Grado*Nivel*tiempo	6	18.312656	3.052109	4.01	0.0025

Tests of Hypotheses Using the Type I MS for Reactor(Grado*Nivel) as an Error Term

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Grado	1	222.483558	222.483558	142.26	<.0001
Nivel	1	1200.474834	1200.474834	767.59	<.0001
Grado*Nivel	1	8.367027	8.367027	5.35	0.0495

E. Anexo. Rendimiento máximo de arabinosa y AX en función de las variables del diseño experimental: concentración NaOH, temperatura y agitación

F. Anexo. Curvas y ajuste de los datos experimentales para los azúcares monoméricos por separado: xilosa y arabinosa, según el modelo de Saeman

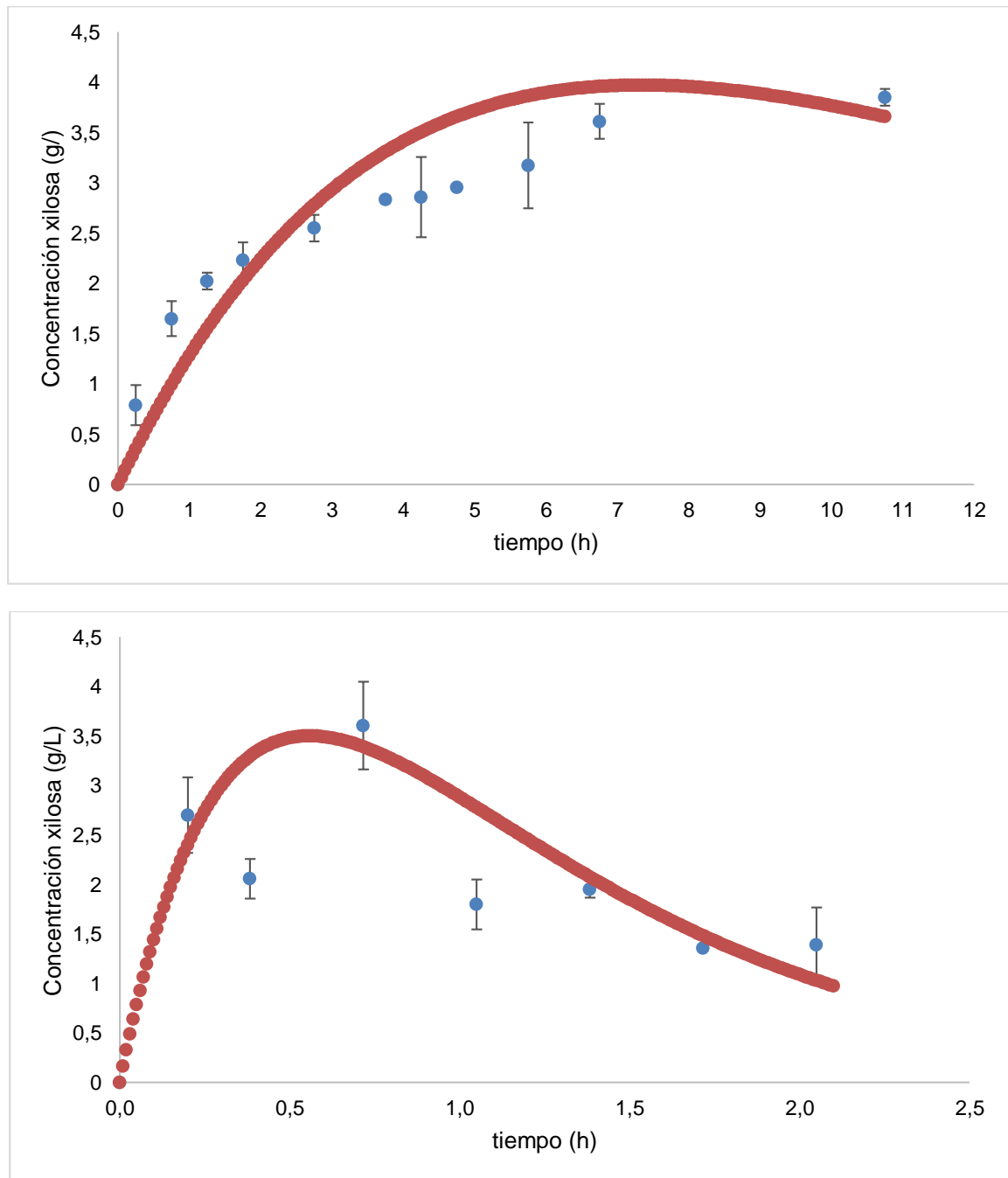


Figura F-1. Datos experimentales de la concentración de xilosa extraídos en el líquido de pre-tratamiento y datos predichos por el modelo de Saeman para los ensayos (A) Severo nivel bajo y (B) Severo nivel alto

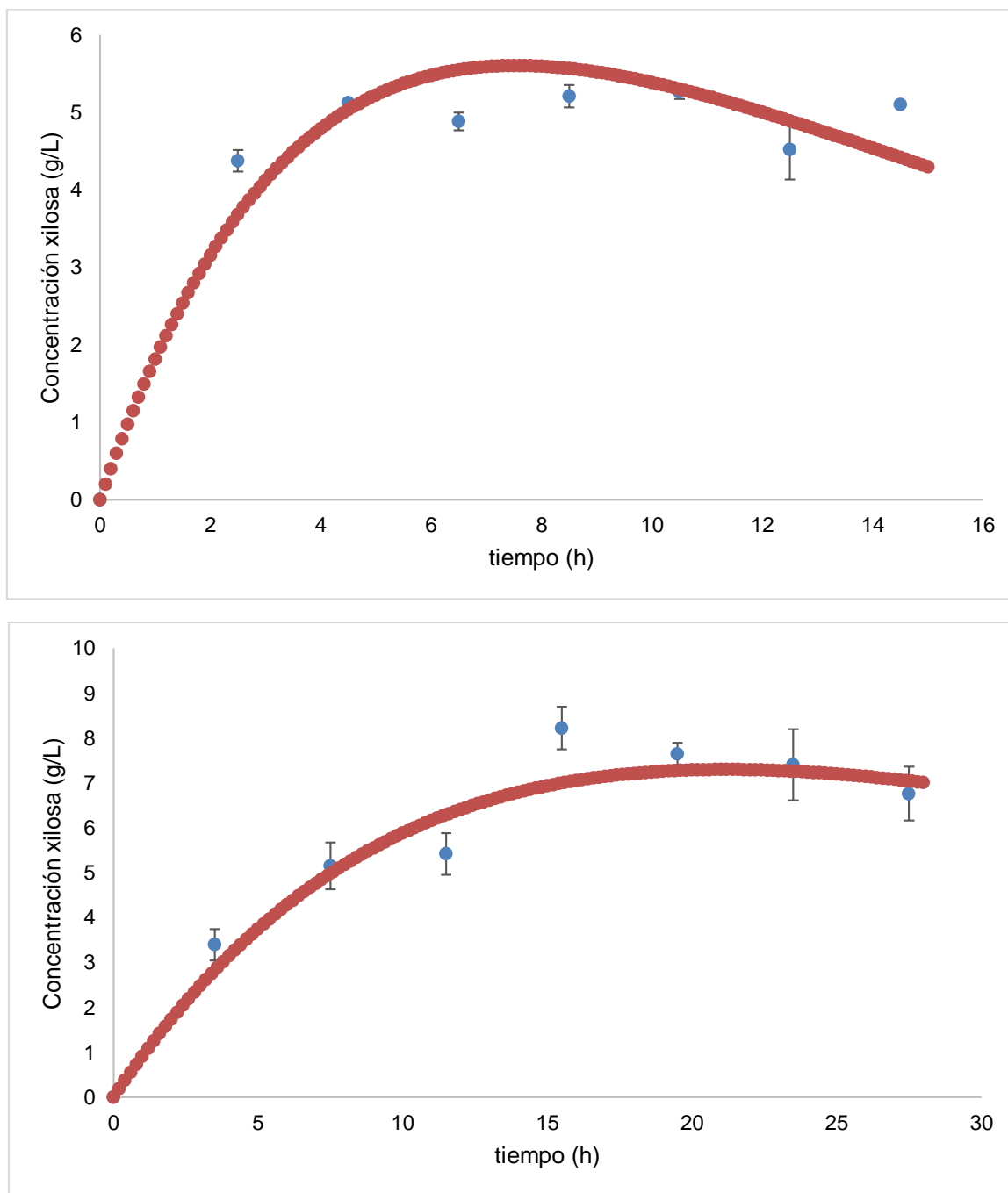


Figura F-2. Datos experimentales de la concentración de xilosa extraídos en el líquido de pre-tratamiento y datos predichos por el modelo de Saeman para los ensayos (A) Moderado nivel bajo y (B) Moderado nivel alto

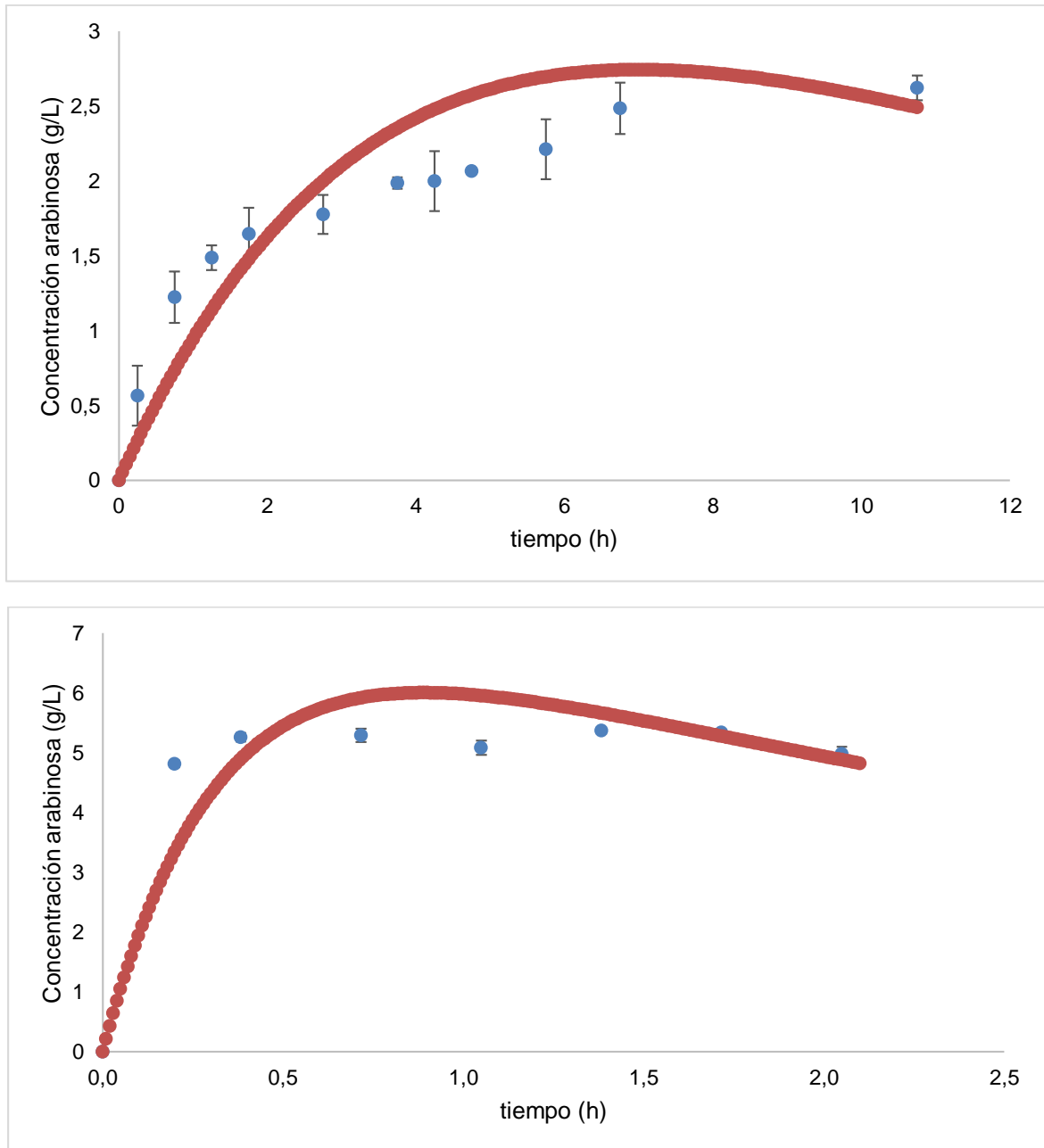


Figura F-4. Datos experimentales de la concentración de arabinosa extraídos en el líquido de pre-tratamiento y datos predichos por el modelo de Saeman para los ensayos (A) Severo nivel bajo y (B) Severo nivel alto

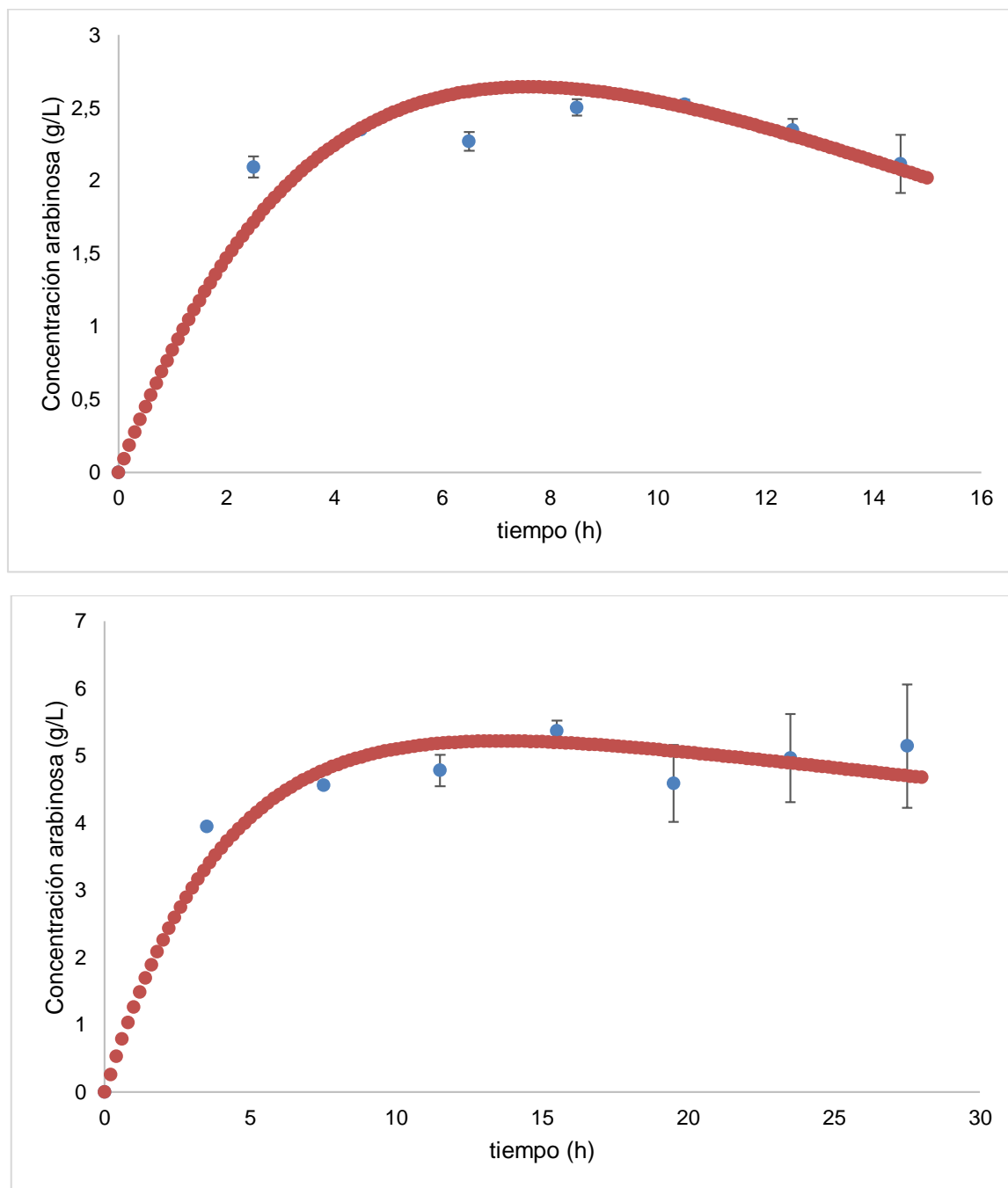


Figura F-4. Datos experimentales de la concentración de arabinosa extraídos en el líquido de pre-tratamiento y datos predichos por el modelo de Saeman para los ensayos (A) Moderado nivel bajo y (B) Moderado nivel alto

G. Anexo. Análisis estadístico ANACOVA

Statistix 10,0 (30-day Trial)
1:17:09 p. m.

11/04/2018;

Analysis of Variance Table for celulosa

Source	DF	SS	MS	F	P
Grado	1	27,707	27,707	11,24	0,0122
Nivel	1	174,443	174,443	70,74	0,0001
Grado*Nivel	1	27,074	27,074	10,98	0,0129
icel	1	0,534	0,534	0,22	0,6557
Error	7	17,263	2,466		
Total	11				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 43,285
CV 3,63

Covariate Summary Table

Covariate	Coefficient	Std Error	T	P
icel	-0,65852	1,41455	-0,47	0,6557

Statistix 10,0 (30-day Trial)
1:28:07 p. m.

11/04/2018;

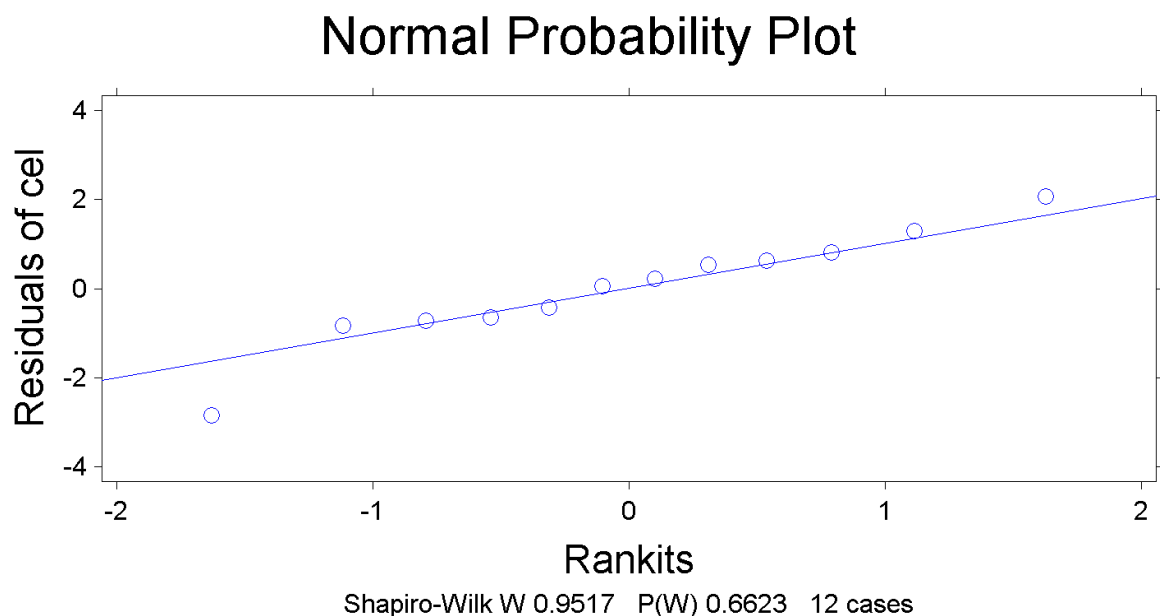
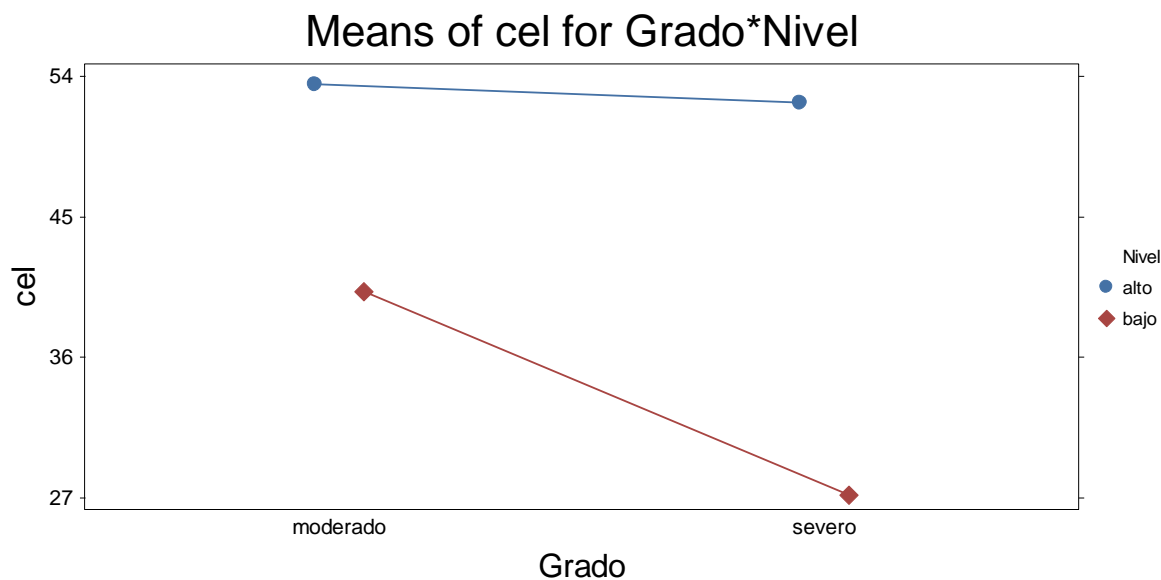
Scheffe All-Pairwise Comparisons Test of cel for Grado*Nivel

Grado	Nivel	Mean	Homogeneous Groups
moderado	alto	53,452	A
severo	alto	52,306	A
moderado	bajo	40,204	A
severo	bajo	27,178	B

Alpha 0,05 Standard Error for Comparison 1,2953 TO 4,2035

Critical F Value 4,347 Critical Value for Comparison 4,6776 TO 15,180

There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.



Statistix 10,0 (30-day Trial)
8:32:36 p. m.

11/04/2018;

Analysis of Variance Table for hemicelulosa

Source	DF	SS	MS	F	P
Grado	1	200,725	200,725	549,22	0,0000
Nivel	1	138,843	138,843	379,90	0,0000
Grado*Nivel	1	7,545	7,545	20,64	0,0027
ihemi	1	0,354	0,354	0,97	0,3581
Error	7	2,558	0,365		
Total	11				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 16,974
CV 3,56

Covariate Summary Table

Covariate	Coefficient	Std Error	T	P
ihemi	0,31798	0,32330	0,98	0,3581

Statistix 10,0 (30-day Trial)
8:38:19 p. m.

11/04/2018;

Scheffe All-Pairwise Comparisons Test of hemi for Grado*Nivel

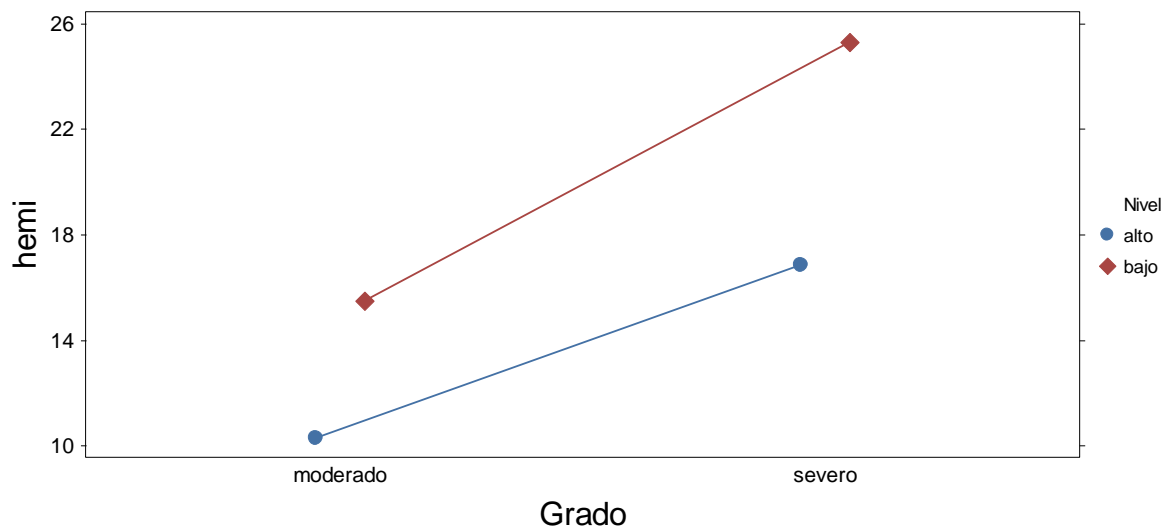
Grado	Nivel	Mean	Homogeneous Groups
severo	bajo	25,306	A
severo	alto	16,851	B
moderado	bajo	15,470	B
moderado	alto	10,269	C

Alpha 0,05 Standard Error for Comparison 0,4936 TO 0,5057

Critical F Value 4,347 Critical Value for Comparison 1,7825 TO 1,8262

There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

Means of hemi for Grado*Nivel



Statistix 10,0 (30-day Trial)
8:56:21 p. m.

11/04/2018;

Analysis of Variance Table for lignina

Source	DF	SS	MS	F	P
Grado	1	7,338	7,338	3,28	0,1130
Nivel	1	117,019	117,019	52,33	0,0002

Grado*Nivel	1	148,110	148,110	66,24	0,0001
ilig	1	2,616	2,616	1,17	0,3153
Error	7	15,653	2,236		
Total	11				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 10,925
CV 13,69

Covariate Summary Table

Covariate	Coefficient	Std Error	T	P
ilig	0,41609	0,38468	1,08	0,3153

Statistix 10,0 (30-day Trial)
8:56:54 p. m.

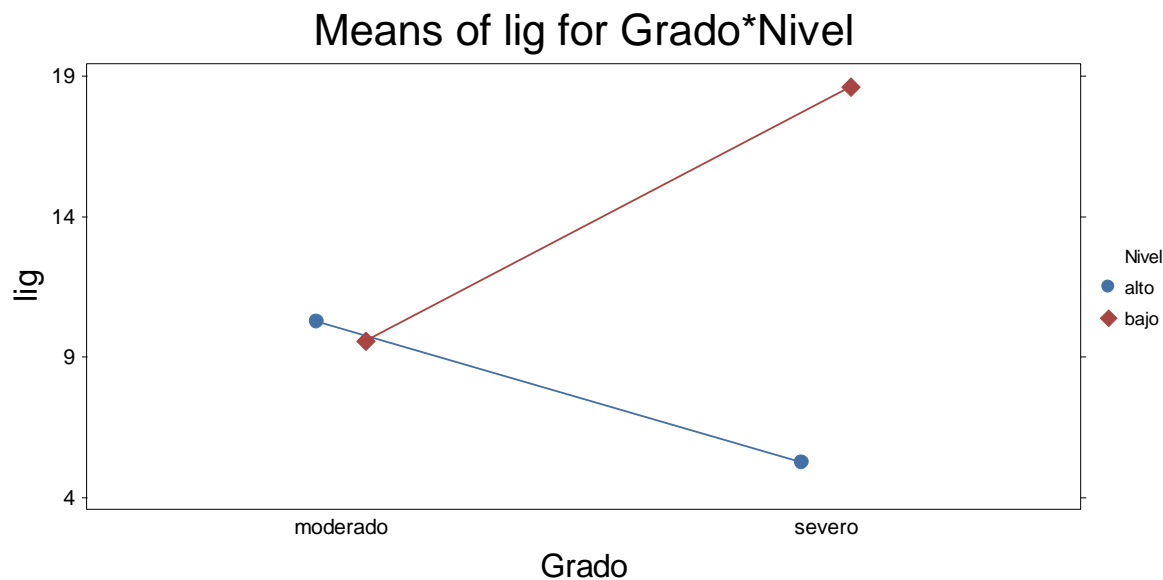
11/04/2018;

Scheffe All-Pairwise Comparisons Test of lig for Grado*Nivel

Grado	Nivel	Mean	Homogeneous Groups
severo	bajo	18,611	A
moderado	alto	10,265	B
moderado	bajo	9,577	B
severo	alto	5,247	B

Alpha 0,05 Standard Error for Comparison 1,2300 TO
1,4844
Critical F Value 4,347 Critical Value for Comparison 4,4416 TO
5,3604

There are 2 groups (A and B) in which the means
are not significantly different from one another.



Statistix 10,0 (30-day Trial)
10:14:02 p. m.

11/04/2018;

Analysis of Variance Table for proteina

Source	DF	SS	MS	F	P
Grado	1	2,25333	2,25333	25,04	0,0010
Nivel	1	2,80333	2,80333	31,15	0,0005
Grado*Nivel	1	0,40333	0,40333	4,48	0,0671
Error	8	0,72000	0,09000		
Total	11	6,18000			

Grand Mean 2,6000

CV 11,54

Note: Covariate iprot was dropped from the model
because of high correlations with other covariates and/or factors.

Statistix 10,0 (30-day Trial)
10:15:36 p. m.

11/04/2018;

Scheffe All-Pairwise Comparisons Test of prot for Grado*Nivel

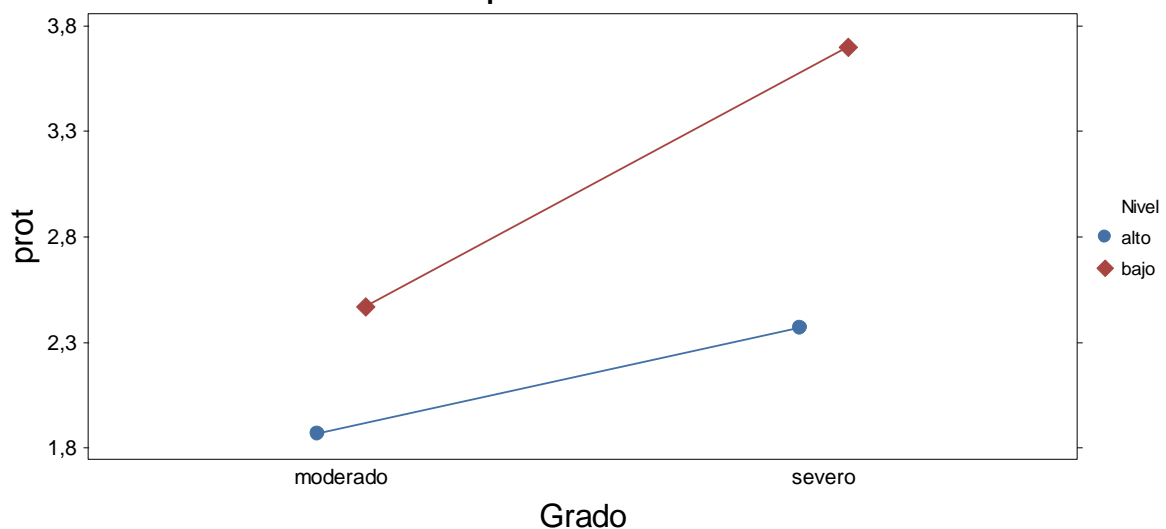
Grado	Nivel	Mean	Homogeneous Groups
severo	bajo	3,7000	A
moderado	bajo	2,4667	B
severo	alto	2,3667	B
moderado	alto	1,8667	B

Alpha 0,05 Standard Error for Comparison 0,2449

Critical F Value 4,066 Critical Value for Comparison 0,8555

There are 2 groups (A and B) in which the means
are not significantly different from one another.

Means of prot for Grado*Nivel



H. Anexo. Caracterización de los líquidos de pre-tratamientos del SE, en cuanto a la concentración de los azúcares neutros libres y azúcares totales

Nomenclatura del ensayo	pH	Concentración azúcares neutros libres en el líquido del pre-tratamiento (g/L)				Concentración de azúcares neutros totales después de la hidrólisis ácida del líquido de pre-tratamiento (g/L)			
		Glu	Xil	Gal	Ara	Glu	Xil	Gal	Ara
SE1	2,4	1,10	1,12	0,16	4,10	4,45	9,62	0,49	5,24
SE2	2,5	1,05	1,08	0,14	3,93	4,62	10,05	0,56	5,49
SE3	2,1	2,47	5,11	0,62	6,96	6,30	14,71	0,97	6,99
SE4	2,4	1,76	5,23	0,50	4,67	4,67	11,67	0,90	5,34
SE5	2,2	2,15	5,45	0,53	5,56	5,91	13,95	0,99	6,64
SE6	2,8	1,63	4,69	0,49	4,26	4,12	9,73	0,61	4,59
SE7	5,9	0,48	0,15	0,13	0,76	4,05	3,39	0,20	2,34
SE8	5,9	0,48	0,22	0,14	0,95	3,81	5,27	0,37	3,06

I. Anexo. Análisis estadístico modelo factorial 2*2 para los ensayos de SE**Analizar Experimento - Xil-Liq****Análisis de Varianza para Xil-Liq**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Temperatura	140,422	1	140,422	231,15	0,0418
B:Tiempo	27,735	1	27,735	45,65	0,0935
AA	156,241	1	156,241	257,19	0,0396
AB	6,0025	1	6,0025	9,88	0,1961
Error total	0,6075	1	0,6075		
Total (corr.)	331,008	5			

R-cuadrada = 99,8165 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 99,0823 por ciento

Error estándar del est. = 0,779423

Error absoluto medio = 0,3

Estadístico Durbin-Watson = 3,33333

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,75

Analizar Experimento - Xil-Sol**Análisis de Varianza para Xil-Sol**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Temperatura	571,21	1	571,21	388,58	0,0323
B:Tiempo	50,46	1	50,46	34,33	0,1076
AA	292,053	1	292,053	198,68	0,0451
AB	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
Error total	1,47	1	1,47		
Total (corr.)	915,193	5			

R-cuadrada = 99,8394 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 99,1969 por ciento

Error estándar del est. = 1,21244

Error absoluto medio = 0,466667

Estadístico Durbin-Watson = 3,33333

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,75

Analizar Experimento - Xil-Tot**Análisis de Varianza para Xil-Tot**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Temperatura	145,203	1	145,203	38,82	0,1013
B:Tiempo	3,52667	1	3,52667	0,94	0,5094
AA	20,5408	1	20,5408	5,49	0,2568
AB	6,0025	1	6,0025	1,60	0,4254
Error total	3,74083	1	3,74083		
Total (corr.)	179,013	5			

R-cuadrada = 97,9103 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 89,5515 por ciento
 Error estándar del est. = 1,93412
 Error absoluto medio = 0,744444
 Estadístico Durbin-Watson = 3,33333
 Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,75

Analizar Experimento - Glu-Liq

Análisis de Varianza para Glu-Liq

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Temperatura	8,41	1	8,41	157,69	0,0506
B:Tiempo	1,40167	1	1,40167	26,28	0,1226
AA	12,0	1	12,0	225,00	0,0424
AB	1,21	1	1,21	22,69	0,1317
Error total	0,0533333	1	0,0533333		
Total (corr.)	23,075	5			

R-cuadrada = 99,7689 por ciento
 R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 98,8443 por ciento
 Error estándar del est. = 0,23094
 Error absoluto medio = 0,0888889
 Estadístico Durbin-Watson = 3,33333
 Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,75

Analizar Experimento - Glu-Sol

Análisis de Varianza para Glu-Sol

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Temperatura	229,522	1	229,522	69,39	0,0761
B:Tiempo	24,0	1	24,0	7,26	0,2263
AA	2,00083	1	2,00083	0,60	0,5792
AB	20,7025	1	20,7025	6,26	0,2421
Error total	3,3075	1	3,3075		
Total (corr.)	279,533	5			

R-cuadrada = 98,8168 por ciento
 R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 94,0839 por ciento
 Error estándar del est. = 1,81865
 Error absoluto medio = 0,7
 Estadístico Durbin-Watson = 3,33333
 Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,75

Analizar Experimento - Glu-Tot(%)

Análisis de Varianza para Glu-Tot(%)

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Temperatura	141,61	1	141,61	73,76	0,0738
B:Tiempo	12,615	1	12,615	6,57	0,2368
AA	22,9633	1	22,9633	11,96	0,1792
AB	12,96	1	12,96	6,75	0,2339
Error total	1,92	1	1,92		
Total (corr.)	192,068	5			

R-cuadrada = 99,0004 por ciento
 R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 95,0018 por ciento

Error estándar del est. = 1,38564
 Error absoluto medio = 0,533333
 Estadístico Durbin-Watson = 3,33333
 Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,75

Analizar Experimento - WIS

Análisis de Varianza para WIS

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Temperatura	100,0	1	100,0	75,00	0,0732
B:Tiempo	28,1667	1	28,1667	21,13	0,1364
AA	12,0	1	12,0	9,00	0,2048
AB	4,0	1	4,0	3,00	0,3333
Error total	1,33333	1	1,33333		
Total (corr.)	145,5	5			

R-cuadrada = 99,0836 por ciento
 R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 95,4181 por ciento
 Error estándar del est. = 1,1547
 Error absoluto medio = 0,444444
 Estadístico Durbin-Watson = 3,33333
 Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,75

Analizar Experimento - WSS

Análisis de Varianza para WSS

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Temperatura	9,0	1	9,0	3,99	0,2954
B:Tiempo	0,666667	1	0,666667	0,30	0,6829
AA	18,2533	1	18,2533	8,10	0,2151
AB	0,64	1	0,64	0,28	0,6883
Error total	2,25333	1	2,25333		
Total (corr.)	30,8133	5			

R-cuadrada = 92,6871 por ciento
 R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 63,4357 por ciento
 Error estándar del est. = 1,50111
 Error absoluto medio = 0,577778
 Estadístico Durbin-Watson = 3,33333
 Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,75

Analizar Experimento - Xilosa

Análisis de Varianza para Xilosa

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Temperatura	4,02003	1	4,02003	9,88	0,1961
B:Tiempo	7,68402	1	7,68402	18,88	0,1440
AA	7,28521	1	7,28521	17,90	0,1478
AB	5,64063	1	5,64063	13,86	0,1671
Error total	0,407008	1	0,407008		
Total (corr.)	25,0369	5			

R-cuadrada = 98,3744 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 91,8718 por ciento
 Error estándar del est. = 0,637972
 Error absoluto medio = 0,245556
 Estadístico Durbin-Watson = 3,33333
 Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,75

Analizar Experimento - HE

Análisis de Varianza para HE

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Temperatura	229,522	1	229,522	953,03	0,0206
B:Tiempo	10,6667	1	10,6667	44,29	0,0949
AA	128,708	1	128,708	534,43	0,0275
AB	46,9225	1	46,9225	194,83	0,0455
Error total	0,240833	1	0,240833		
Total (corr.)	416,06	5			

R-cuadrada = 99,9421 por ciento
 R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 99,7106 por ciento
 Error estándar del est. = 0,490748
 Error absoluto medio = 0,188889
 Estadístico Durbin-Watson = 3,33333
 Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,75

Analizar Experimento - HE-Xil

Análisis de Varianza para HE-Xil

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Temperatura	9,0	1	9,0	1,39	0,4473
B:Tiempo	8,88167	1	8,88167	1,38	0,4494
AA	76,0033	1	76,0033	11,78	0,1805
AB	39,69	1	39,69	6,15	0,2440
Error total	6,45333	1	6,45333		
Total (corr.)	140,028	5			

R-cuadrada = 95,3914 por ciento
 R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 76,957 por ciento
 Error estándar del est. = 2,54034
 Error absoluto medio = 0,977778
 Estadístico Durbin-Watson = 3,33333
 Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,75

Optimización de Múltiples Respuestas

Datos/Variabes:

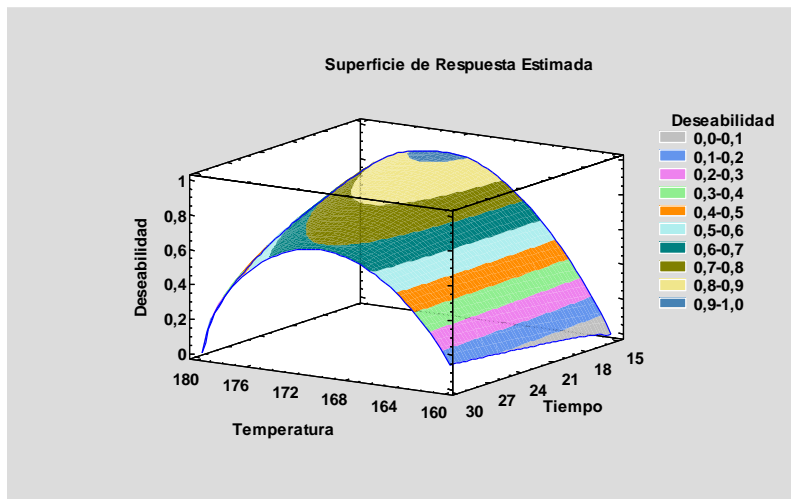
Xil-Liq ((%))
 Xilosa ((g/l))

	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
<i>Respuesta</i>	<i>Observado</i>	<i>Observado</i>
Xil-Liq	27,3	49,8
Xilosa	9,62	14,7

	<i>Deseabilidad</i>	<i>Deseabilidad</i>		<i>Pesos</i>	<i>Pesos</i>	
--	---------------------	---------------------	--	--------------	--------------	--

<i>Respuesta</i>	<i>Baja</i>	<i>Alta</i>	<i>Meta</i>	<i>Primero</i>	<i>Segundo</i>	<i>Impacto</i>
Xil-Liq	27,3	49,8	Maximizar	1,0		3,0
Xilosa	9,62	14,7	Maximizar	1,0		3,0

			<i>Deseabilidad</i>	<i>Deseabilidad</i>
<i>Fila</i>	<i>Xil-Liq</i>	<i>Xilosa</i>	<i>Prevista</i>	<i>Observada</i>
1	27,3	9,62	0,0	0,0
2	44,6	14,7	0,855388	0,876863
3	41,6	14,0	0,74969	0,740256
4	33,6	10,1	0,129954	0,162655
5	49,8	11,7	0,687253	0,639882
6	43,0	9,73	0,0	0,12292
7			0,917018	



Optimizar Deseabilidad

Valor óptimo = 0,920165

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Temperatura	160,0	180,0	173,502
Tiempo	15,0	30,0	15,5425

<i>Respuesta</i>	<i>Óptimo</i>
Xil-Liq	46,3508
Xilosa	14,7

Bibliografía

- Agger, J., & Meyer, A. S. (2011). *Enzymatic hydrolysis of corn bran arabinoxylan: - theory versus practice*. Technical University of Denmark.
- Aguiar, W. B., Faria, L. F. F., Couto, M. A. P. G., Araujo, O. Q. F., & Pereira, N. (2002). Growth model and prediction of oxygen transfer rate for xylitol production from D-xylose by *C. guilliermondii*. *Biochemical Engineering Journal*, 12, 49–59.
- Akinterinwa, O., Khankal, R., & Cirino, P. C. (2008). Metabolic engineering for bioproduction of sugar alcohols. *Current Opinion in Biotechnology*, 19, 461–467. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.08.002>
- Aliyu, S., & Bala, M. (2011). Brewer's spent grain: A review of its potentials and applications. *African Journal of Biotechnology*, 10(3), 324–331. <https://doi.org/10.5897/AJBx10.006>
- Álvarez, C., González, A., Negro, M. J., Ballesteros, I., Oliva, J. M., & Sáez, F. (2017). Optimized use of hemicellulose within a biorefinery for processing high value-added xylooligosaccharides. *Industrial Crops and Products*, 99, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.01.034>
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., & Negro, M. J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, 101(13), 4851–4861. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093>
- Amore, A., Parameswaran, B., Kumar, R., Birolo, L., Vinciguerra, R., Marcolongo, L., ... Faraco, V. (2015). Application of a new xylanase activity from *Bacillus amyloliquefaciens* XR44A in brewer's spent grain saccharification. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 90(3), 573–581. <https://doi.org/10.1002/jctb.4589>
- Arevalo-Gallegos, A., Ahmad, Z., Asgher, M., Parra-Saldivar, R., & Iqbal, H. M. N. (2017). Lignocellulose: A sustainable material to produce value-added products with a zero waste approach—A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 99, 308–318. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.097>
- Azevedo, A., de Oliva, P., Fernandes, D., & Pastore, G. (2013). Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. *Food Research International*, 51(1), 75–85. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.021>
- Ballesteros, I. (2017). Comunicación personal.
- Ballesteros, I., Ballesteros, M., Manzanares, P., Negro, M. J., Oliva, J. M., & Sáez, F.

- (2008). Dilute sulfuric acid pretreatment of cardoon for ethanol production. *Biochemical Engineering Journal*, 42(1), 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.06.001>
- Barbosa, M. F. S., de Medeiros, M. B., de Mancilha, I. M., Schneider, H., & Lee, H. (1988). Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii* *. *Journal of Industrial Microbiology*, 3, 241–251.
- Bartolomé, B., Santos, M., Jime, J. J., Nozal, M. J., & C., G.-C. (2002). Pentoses and Hydroxycinnamic Acids in Brewer's Spent Grain. *Journal of Cereal Science*, 36, 51–58. <https://doi.org/10.1006/jcrs.2002.0442>
- Bavaria. (2013). *Informe de Desarrollo Sostenible 2013*.
- Bavaria. (2016). *Reporte un mundo mejor 2016*.
- Biely, P., Mastihubová, M., la Grange, D. C., Van Zyl, W. H., & Prior, B. A. (2004). Enzyme-coupled assay of acetylxylan esterases on monoacetylated 4-nitrophenyl β -D-xylopyranosides. *Analytical Biochemistry*, 332(1), 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.04.022>
- Biely, P., Singh, S., & Puchart, V. (2016). Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. *Biotechnology Advances*, 34(7), 1260–1274. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.09.001>
- Bohnsack, C., Ternes, W., Büsing, A., & Drotleff, A. M. (2011). Tocotrienol levels in sieving fraction extracts of brewer's spent grain. *European Food Research and Technology*, 232(4), 563–573. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1419-z>
- Buffington, J. (2014). The Economic Potential of Brewer's Spent Grain (BSG) as a Biomass Feedstock. *Advances in Chemical Engineering Adn Science*, 4, 308–318.
- Carvalho, F., Duarte, L. C., & Gírio, F. M. (2008). Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 67, 849–864.
- Carvalho, F., Duarte, L. C., Lopes, S., Parajó, J. C., Pereira, H., & Gírio, F. M. (2005). Evaluation of the detoxification of brewery's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Debaryomyces hansenii* CCMI 941. *Process Biochemistry*, 40, 1215–1223. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.04.015>
- Carvalho, F., Duarte, L. C., Medeiros, R., & Gírio, F. M. (2004). Optimization of Brewery's Spent Grain Dilute-Acid Hydrolysis for the Production of Pentose-Rich Culture Media. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 113–116, 1059–1072.
- Carvalho, F., Esteves, M. P., Parajó, J. C., Pereira, H., & Gírio, F. M. (2004). Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain. *Bioresource Technology*, 91(1), 93–100. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00148-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00148-2)
- Celus, I., Brijis, K., & Delcour, J. A. (2006). The effects of malting and mashing on barley protein extractability. *Journal of Cereal Science*, 44, 203–211.

<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2006.06.003>

- Chandel, A. K., Singh, O. V., & Venkateswar, R. (2010). Biotechnological Applications of Hemicellulosic Derived Sugars: State-of-the-Art. *Sustainable Biotechnology*, 007, 63–81. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-3295-9>
- Cherubini, F. (2010). The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*, 51(7), 1412–1421. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.01.015>
- Chiesa, S., & Gnansounou, E. (2011). Protein extraction from biomass in a bioethanol refinery - Possible dietary applications: Use as animal feed and potential extension to human consumption. *Bioresource Technology*, 102(2), 427–436. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.125>
- Coelho, E., Rocha, M. A., Moreira, A., Domingues, M. R., & Coimbra, M. A. (2016). Revisiting the structural features of arabinoxylans from brewers' spent grain. *Carbohydrate Polymers*, 139, 167–176. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.12.006>
- Coelho, E., Rocha, M. A., Saraiva, J. A., & Coimbra, M. A. (2014). Microwave superheated water and dilute alkali extraction of brewers' spent grain arabinoxylans and arabinoxylo-oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 99, 415–422. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.003>
- Coimbra, M. A., Delgadillo, I., Waldron, K. W., & Selvendran, R. R. (1996). Isolation and analysis of cell wall polymers from olive pulp. *Analytical Biochemistry*, 54(2), 484–489.
- Connolly, A., Piggott, C. O., & Fitzgerald, R. J. (2014). Technofunctional properties of a brewers' spent grain protein-enriched isolate and its associated enzymatic hydrolysates. *LWT - Food Science and Technology*, 59(2), 1061–1067. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.054>
- da Silva, S. S., & Chandel, A. K. (2012). *D-Xylitol Fermentative Production, Application and Commercialization*.
- DANE. (2012). Encuesta anual manufacturera. Retrieved from <http://www.dane.gov.co/index.php/encuesta-anual-manufacturera-eam>
- de Albuquerque, T. L., da Silva, I. J., de Macedo, G. R., & Rocha, M. V. P. (2014). Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic wastes: A review. *Process Biochemistry*, 49(11), 1779–1789. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.07.010>
- Dhillon, G. S., Kaur, S., & Brar, S. K. (2012). In-vitro decolorization of recalcitrant dyes through an ecofriendly approach using laccase from *Trametes versicolor* grown on brewer's spent grain. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 72, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.05.012>
- Dung, N. N. X., Manh, L. H., & Udén, P. (2002). Tropical fibre sources for pigs—digestibility, digesta retention and estimation of fibre digestibility in vitro. *Animal Feed Science and Technology*, 102, 109–124. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(02\)00253-5](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(02)00253-5)

- Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, I., & Ballesteros, M. (2016). Chapter 15: Steam explosion as lignocellulosic biomass pretreatment. In *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery* (pp. 349–364).
- Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, I., Negro, M. J., Oliva, J. M., Saez, F., & Ballesteros, M. (2013). Optimization of integrated alkaline-extrusion pretreatment of barley straw for sugar production by enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry*, *48*, 775–781. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.03.003>
- Duvernay, W. H., Chinn, M. S., & Yencho, G. C. (2013). Hydrolysis and fermentation of sweetpotatoes for production of fermentable sugars and ethanol. *Industrial Crops and Products*, *42*, 527–537. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.06.028>
- Escarnot, E., Aguedo, M., & Paquot, M. (2011). Characterization of hemicellulosic fractions from spelt hull extracted by different methods. *Carbohydrate Polymers*, *85*(2), 419–428. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.03.005>
- Faulds, C. B., Sancho, A. I., & Bartolomé, B. (2003). Mono- and dimeric ferulic acid release from brewer's spent grain by fungal feruloyl esterases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *60*(4), 489–493. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1140-3>
- Forssell, P., Kontkanen, H., Schols, H. A., Hinz, S., Eijssink, V. G. H., Treimo, J., ... Buchert, J. (2008). Hydrolysis of Brewers' Spent Grain by Carbohydrate Degrading Enzymes. *Journal of the Institute of Brewing*, *114*(4), 306–314. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2008.tb00774.x>
- Foyle, T., Jennings, L., & Mulcahy, P. (2007). Compositional analysis of lignocellulosic materials: evaluation of methods used for sugar analysis of waste paper and straw. *Bioresource Technology*, *98*(16), 3026–3036. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.10.013>
- Garrote, G., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (1999). Mild autohydrolysis: An environmentally friendly technology for xylooligosaccharide production from wood. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *74*(11), 1101–1109. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4660\(199911\)74:11<1101::AID-JCTB146>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4660(199911)74:11<1101::AID-JCTB146>3.0.CO;2-M)
- Gilbert, H. J., & Hazlewood, G. P. (1993). Bacterial cellulases and xylanases. *Journal of General Microbiology*, *139*(2), 187–194. <https://doi.org/10.1099/00221287-139-2-187>
- Gírio, F. M., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., & Bogel-Lukasik, R. (2012). Chapter 1. Deconstruction of the Hemicellulose Fraction from Lignocellulosic Materials into Simple Sugars. In *D-Xylitol Fermentative Production, Application and Commercialization* (pp. 3–37). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-31887-0>
- Goli, J. K., Panda, S. H., & Linga, V. R. (2012). Chapter 4. Molecular Mechanism of D-Xylitol Production in Yeasts: Focus on Molecular Transportation, Catabolic Sensing and Stress Response. In *D-Xylitol Fermentative Production, Application and Commercialization*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-31887-0>
- Haghighi Mood, S., Hossein Golfeshan, A., Tabatabaei, M., Salehi Jouzani, G., Najafi, G.

- H., Gholami, M., & Ardjmand, M. (2013). Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 77–93. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.033>
- Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, a, Sluiter, J., & Templeton, D. (2008). Preparation of Samples for Compositional Analysis Laboratory Analytical Procedure (LAP) Issue Date : 8 / 06 / 2008 Preparation of Samples for Compositional Analysis Laboratory Analytical Procedure (LAP). *National Renewable Energy Laboratory*, (August), 1–9.
- Höije, A., Sandström, C., Roubroeks, J. P., Andersson, R., Gohil, S., & Gatenholm, P. (2006). Evidence of the presence of 2-O-β-d-xylopyranosyl-α-l-arabinofuranose side chains in barley husk arabinoxylan. *Carbohydrate Research*, 341(18), 2959–2966. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.10.008>
- Holopainen-Mantila, U. (2015). *Composition and structure of barley (Hordeum vulgare L.) grain in relation to end uses*. University of Helsinki.
- Houghton, J., Weatherwas, S., & Ferrel, J. (2005). Breaking the Biological Barriers to Cellulosic Ethanol: A Joint Research Agenda.
- Huang, C., Jiang, Y.-F., Guo, G., & Hwang, W.-S. (2011). Development of a yeast strain for xylitol production without hydrolysate detoxification as part of the integration of co-product generation within the lignocellulosic ethanol process. *Bioresource Technology*, 102(3), 3322–3329. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.111>
- Kastner, J. R., Eiteman, M. A., & Lee, S. A. (2001). Glucose repression of xylitol production in *Candida tropicalis* mixed-sugar fermentations. *Biotechnology Letters*, 23(20), 1663–1667.
- Kaur, S., Dhillon, G. S., Sarma, S. J., Brar, S. K., Misra, K., & Oberoi, H. S. (2014). Chapter 1. Waste Biomass: A Prospective Renewable Resource for Development of Bio-Based Economy/Processes. In *Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals* (pp. 3–28). <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8005-1>
- Kemppainen, K., Rommi, K., Holopainen, U., & Kruus, K. (2016). Steam explosion of Brewer's spent grain improves enzymatic digestibility of carbohydrates and affects solubility and stability of proteins. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 180(1), 94–108. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2085-9>
- Kim, T. H., Taylor, F., & Hicks, K. B. (2008). Bioethanol production from barley hull using SAA (soaking in aqueous ammonia) pretreatment. *Bioresource Technology*, 99, 5694–5702. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.10.055>
- Kirin Beer University Report. (2017). Global Beer Production by Country in 2016. Retrieved from http://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2017/0810_01.html
- Klinke, H. B., Thomsen, a. B., & Ahring, B. K. (2004). Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(1), 10–26. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1642-2>

- Kordialik-Bogacka, E. (2014). *Saccharomyces pastorianus* immobilized on brewer's spent grain in continuous system for lead ion biosorption. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 96, 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.09.018>
- Kotlar, C. E., Ponce, A. G., & Roura, S. I. (2013). Improvement of functional and antimicrobial properties of brewery byproduct hydrolysed enzymatically. *LWT - Food Science and Technology*, 50(2), 378–385. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.09.005>
- Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., & Stroeve, P. (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 48(8), 3713–3729. <https://doi.org/10.1021/ie801542g>
- Lagaert, S., Pollet, A., Courtin, C. M., & Volckaert, G. (2014). β -Xylosidases and α -L-arabinofuranosidases: Accessory enzymes for arabinoxylan degradation. *Biotechnology Advances*, 32(2), 316–332. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.11.005>
- Laine, C., Kemppainen, K., Kuutti, L., Varhimo, A., Asikainen, S., Grönroos, A., ... Harlin, A. (2015a). Extraction of xylan from wood pulp and brewer's spent grain. *Industrial Crops and Products*, 70, 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.009>
- Laine, C., Kemppainen, K., Kuutti, L., Varhimo, A., Asikainen, S., Grönroos, A., ... Harlin, A. (2015b). Extraction of xylan from wood pulp and brewer's spent grain. *Industrial Crops and Products*, 70, 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.009>
- Li, H., Dai, Q., Ren, J., Jian, L., Peng, F., Sun, R., & Liu, G. (2016). Effect of structural characteristics of corncob hemicelluloses fractionated by graded ethanol precipitation on furfural production. *Carbohydrate Polymers*, 136, 203–209. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.09.045>
- Li, Z., Guo, X., Feng, X., & Li, C. (2015). An environment friendly and efficient process for xylitol bioconversion from enzymatic corncob hydrolysate by adapted *Candida tropicalis*. *CHEMICAL ENGINEERING JOURNAL*, 263, 249–256. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.11.013>
- Liu, H., Pang, B., Zhao, Y., Lu, J., Han, Y., & Wang, H. (2018). Comparative study of two different alkali-mechanical pretreatments of corn stover for bioethanol production. *Fuel*, 221(November 2017), 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.02.088>
- Liu, Y., Wang, J., & Wolcott, M. (2017). Modeling the production of sugar and byproducts from acid bisulfite pretreatment and enzymatic hydrolysis of Douglas-fir. *Bioresource Technology*, 224, 389–396. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.071>
- Mandalari, G., Faulds, C. B., Sancho, A. I., Saija, A., Bisignano, G., Locurto, R., & Waldron, K. W. (2005). Fractionation and characterisation of arabinoxylans from brewers' spent grain and wheat bran. *Journal of Cereal Science*, 42, 205–212. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2005.03.001>
- Marcolongo, L., Ionata, E., La Cara, F., Amore, A., Giacobbe, S., Pepe, O., & Faraco, V. (2014). The effect of *Pleurotus ostreatus* arabinofuranosidase and its evolved variant

- in lignocellulosic biomasses conversion. *Fungal Genetics and Biology*, 72, 162–167. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.07.003>
- Martínez-Maqueda, D., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Miralles, B., & Gómez-Rueda, J. Á. (2013). Chapter 2 Extraction/Fractionation Techniques for Proteins and Peptides and Protein Digestion. In *Proteomics in Foods: Principles and Applications* (pp. 21–50). <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5626-1>
- McCarthy, A. L., O'Callaghan, Y. C., Connolly, A., Piggott, C. O., FitzGerald, R. J., & O'Brien, N. M. (2013). In vitro antioxidant and anti-inflammatory effects of brewers' spent grain protein rich isolate and its associated hydrolysates. *Food Research International*, 50(1), 205–212. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.10.022>
- McCleary, B. V., Mckie, V. A., Draga, A., Rooney, E., Mangan, D., & Larkin, J. (2015). Hydrolysis of wheat flour arabinoxylan, acid-debranched wheat flour arabinoxylan and arabino-xylo-oligosaccharides by b-xylanase, a-L-arabinofuranosidase and b-xylosidase. *Carbohydrate Research*, 407, 79–96. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2015.01.017>
- Meyer, A. S., Rosgaard, L., & Sørensen, H. R. (2009). The minimal enzyme cocktail concept for biomass processing. *Journal of Cereal Science*, 50(3), 337–344. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2009.01.010>
- Mills, T. Y., Sandoval, N. R., & Gill, R. T. (2009). Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanisms in Escherichia coli. *Biotechnology for Biofuels*, 2(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-2-26>
- Mohd Salleh, N. H., Mohamed Daud, M. Z., Arbain, D., Ahmad, M. S., & Ku Ismail, K. S. (2011). Optimization of alkaline hydrolysis of paddy straw for ferulic acid extraction. *Industrial Crops and Products*, 34(3), 1635–1640. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.06.010>
- Moreno, A. D., Ibarra, D., Ballesteros, I., González, A., & Ballesteros, M. (2013). Comparing cell viability and ethanol fermentation of the thermotolerant yeast Kluyveromyces marxianus and Saccharomyces cerevisiae on steam-exploded biomass treated with laccase. *Bioresource Technology*, 135, 239–245. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.095>
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M., & Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96(6), 673–686. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.06.025>
- Mpabanga, T. P., Chandel, A. K., Silvério, S., & Singh, O. V. (2012). Chapter 3. Detoxification Strategies Applied to Lignocellulosic Hydrolysates for Improved Xylitol Production. In *D-Xylitol Fermentative Production, Application and Commercialization* (pp. 63–82). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-31887-0>
- Murzin, D. Y. (2013). 3 Engineering reactions. In *Engineering catalysis* (pp. 165–276).

- Mussatto, S., Dragone, G., & Roberto, I. (2005). Influence of the toxic compounds present in brewer's spent grain hemicellulosic hydrolysate on xylose-to-xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*. *Process Biochemistry*, 40(12), 3801–3806. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.06.024>
- Mussatto, S. I., Dragone, G., & Roberto, I. C. (2005). Kinetic behavior of *Candida guilliermondii* yeast during Xylitol Production from Brewer's Spent Grain Hemicellulosic Hydrolysate. *Biotechnology Progress*, 39(11), 1433–1439. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00261-9](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00261-9)
- Mussatto, S. I., Dragone, G., & Roberto, I. C. (2006). Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science*, 43, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2005.06.001>
- Mussatto, S. I., Dragone, G., & Roberto, I. C. (2007). Ferulic and p-coumaric acids extraction by alkaline hydrolysis of brewer's spent grain. *Industrial Crops and Products*, 25(2), 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2006.11.001>
- Mussatto, S. I., Dragone, G., Rocha, G. J. M., & Roberto, I. C. (2006). Optimum operating conditions for brewer's spent grain soda pulping. *Carbohydrate Polymers*, 64, 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.10.033>
- Mussatto, S. I., Fernandes, M., Milagres, A. M. F., & Roberto, I. C. (2008). Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(2), 124–129. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.11.006>
- Mussatto, S. I., Fernandes, M., Rocha, G. J. M., Órfão, J. J. M., Teixeira, J. A., & Roberto, I. C. (2010). Production, characterization and application of activated carbon from brewer's spent grain lignin. *Bioresource Technology*, 101(7), 2450–2457. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.025>
- Mussatto, S. I., Moncada, J., Roberto, I. C., & Cardona, C. A. (2013). Techno-economic analysis for brewer's spent grains use on a biorefinery concept: The Brazilian case. *Bioresource Technology*, 148, 302–310. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.046>
- Mussatto, S. I., & Roberto, I. C. (2005). Acid hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain to produce xylitol. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(14), 2453–2460. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2276>
- Mussatto, S. I., & Roberto, I. C. (2006). Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81(3), 268–274. <https://doi.org/10.1002/jctb.1374>
- Mussatto, S. I., & Roberto, I. C. (2008). Establishment of the optimum initial xylose concentration and nutritional supplementation of brewer's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Process Biochemistry*, 43(5), 540–546. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.01.013>
- Mussatto, S. I., Rocha, G. J. M., & Roberto, I. C. (2008). Hydrogen peroxide bleaching of

- cellulose pulps obtained from brewer's spent grain. *Cellulose*, 15(4), 641–649. <https://doi.org/10.1007/s10570-008-9198-4>
- Nabarlantz, D., Ebringerová, A., & Montané, D. (2007). Autohydrolysis of agricultural by-products for the production of xylo-oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 69(1), 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.08.020>
- Negahdar, L., Delidovich, I., & Palkovits, R. (2016). Aqueous-phase hydrolysis of cellulose and hemicelluloses over molecular acidic catalysts: Insights into the kinetics and reaction mechanism. *Applied Catalysis B: Environmental*, 184, 285–298. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2015.11.039>
- Negro, M. J., Duque, A., Manzanares, P., Sáez, F., Oliva, J. M., Ballesteros, I., & Ballesteros, M. (2015). Alkaline twin-screw extrusion fractionation of olive-tree pruning biomass. *Industrial Crops and Products*, 74, 336–341. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.018>
- Niemi, P., Faulds, C. B., Sibakov, J., Holopainen, U., Poutanen, K., & Buchert, J. (2012). Effect of a milling pre-treatment on the enzymatic hydrolysis of carbohydrates in brewer's spent grain. *Bioresource Technology*, 116, 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.043>
- Niemi, P., Martins, D., Buchert, J., & Faulds, C. B. (2013). Pre-hydrolysis with carbohydrases facilitates the release of protein from brewer's spent grain. *Bioresource Technology*, 136, 529–534. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.076>
- Oliva Domínguez, J. M. (2003). *Efecto de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre Kluyveromyces marxianus*. Universidad Complutense de Madrid. <https://doi.org/ISBN: 978-84-693-1123-3>
- Ortíz, I., & Quintero, R. (2014). Chapter 4. Recent Advancements in Pretreatment Technologies of Biomass to Produce Bioenergy. In *Bioenergy Research: Advances and Applications* (pp. 57–69). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59561-4.00004-8>
- Parajó, J. C., Domínguez, H., & Domínguez, J. M. (1998). Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. *Bioresource Technology*, 65(3), 191–201. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(98\)00038-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00038-8)
- Parawira, W., & Tekere, M. (2011). Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production : review, 31(March 2010), 20–31. <https://doi.org/10.3109/07388551003757816>
- Pejin, J., Radosavljević, M., Mojović, L., Kocić-Tanackov, S., & Djukić-Vuković, A. (2015). The influence of calcium-carbonate and yeast extract addition on lactic acid fermentation of brewer's spent grain hydrolysate. *Food Research International*, 73, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.12.023>
- Pereira, H., Graca, J., & Rodríguez, J. C. (2003). Wood chemistry in relation to quality.
- Piddocke, M. P., Kreisz, S., Heldt-Hansen, H. P., Nielsen, K. F., & Olsson, L. (2009).

- Physiological characterization of brewer's yeast in high-gravity beer fermentations with glucose or maltose syrups as adjuncts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(3), 453–464. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1930-y>
- Ping, Y., Ling, H.-Z., Song, G., & Ge, J.-P. (2013). Xylitol production from non-detoxified corncob hemicellulose acid hydrolysate by *Candida tropicalis*. *Biochemical Engineering Journal*, 75, 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.03.022>
- Ponte Rocha, M. V., Soares Rodrigues, T. H., de Albuquerque, T. L., Gonçalves, L. R. B., & de Macedo, G. R. (2014). Evaluation of dilute acid pretreatment on cashew apple bagasse for ethanol and xylitol production. *Chemical Engineering Journal*, 243, 234–243. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.12.099>
- Rafiqul, I. S. M., & Mimi Sakinah, A. M. (2012). A perspective Bioproduction of xylitol by enzyme technology and future prospects. *International Food Research Journal*, 19(2), 405–408.
- Rasmussen, L. E., Xu, C., Sørensen, J. F., Nielsen, M. K., & Meyer, A. S. (2012). Enzyme kinetics and identification of the rate-limiting step of enzymatic arabinoxylan degradation. *Biochemical Engineering Journal*, 69, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.08.004>
- Ravella, S. R., Gallagher, J., Fish, S., & Prakasham, R. S. (2012). Overview on Commercial Production of Xylitol, Economic Analysis and Market Trends. In *D-Xylitol Fermentative Production, Application and Commercialization* (pp. 291–306). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-31887-0>
- Reis, S. F., Coelho, E., Coimbra, M. A., & Abu-Ghannam, N. (2015a). Improved efficiency of brewer's spent grain arabinoxylans by ultrasound-assisted extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 24, 155–164. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.10.010>
- Reis, S. F., Coelho, E., Coimbra, M. A., & Abu-Ghannam, N. (2015b). Influence of grain particle sizes on the structure of arabinoxylans from brewer's spent grain. *Carbohydrate Polymers*, 130, 222–226. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.05.031>
- Reis, S. F., Gullón, B., Gullón, P., Ferreira, S., Maia, C. J., Alonso, J. L., ... Abu-Ghannam, N. (2014). Evaluation of the prebiotic potential of arabinoxylans from brewer's spent grain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 9365–9373. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6009-8>
- Roberto, I. C., de Mancilha, I. M., & Sato, S. (1999). Influence of kLa on bioconversion of rice straw hemicellulose hydrolysate to xylitol. *Bioprocess Engineering*, 21(6), 505–508. <https://doi.org/10.1007/PL00009089>
- Rodríguez, M. (2015). Comunicación personal.
- Rommi, K. (2016). *Enzyme-aided recovery of protein and protein hydrolyzates from rapeseed cold-press cake*. University of Helsinki.
- Rommi, K., Niemi, P., Kemppainen, K., & Kruus, K. (2018). Impact of thermochemical pretreatment and carbohydrate and protein hydrolyzing enzyme treatment on

- fractionation of protein and lignin from brewer's spent grain. *Journal of Cereal Science*, 79, 168–173. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2017.10.005>
- Saeman, J. F. (1945). Hydrolysis of Cellulose and Decomposition of Sugars in Dilute Acid at High Temperature. *Industrial and Engineering Chemistry*, 37(9), 43–52. <https://doi.org/10.1021/le50421a009>
- Sáez, F., & Álvarez, C. (2017). Comunicación personal.
- Saha, B. C. (2003). Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(5), 279–291. <https://doi.org/10.1007/s10295-003-0049-x>
- Salgado, J. M., Converti, A., & Domínguez, J. M. (2012). Chapter 7. Fermentation Strategies Explored for Xylitol Production. In *D-Xylitol Fermentative Production, Application and Commercialization* (pp. 161–191). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-31887-0>
- Sari, Y. W., Mulder, W. J., Sanders, J. P. M., & Bruins, M. E. (2015). Towards plant protein refinery: Review on protein extraction using alkali and potential enzymatic assistance. *Biotechnology Journal*, 10, 1138–1157. <https://doi.org/10.1002/biot.201400569>
- Sari, Y. W., Syafitri, U., Sanders, J. P. M., & Bruins, M. E. (2015). How biomass composition determines protein extractability. *Industrial Crops and Products*, 70, 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.020>
- Senthilkumar, S., Viswanathan, T. V., Mercy, A. D., Gangadevi, P., Ally, K., & Shyama, K. (2010). Chemical composition of Brewery waste*. *Tamilnadu Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 6(1), 49–51.
- Shavandi, A., Hu, Z., Teh, S., Zhao, J., Carne, A., Bekhit, A., & Bekhit, A. E.-D. A. (2017). Antioxidant and functional properties of protein hydrolysates obtained from squid pen chitosan extraction effluent. *Food Chemistry*, 227, 194–201. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.099>
- Shindo, S., & Tachibana, T. (2006). Production of bioethanol from spent grain, a by-product of beer production. *MBA Technical Quarterly*, 43(3), 34189–34193.
- Sjöström, E. (1993). *Wood chemistry. In: Fundamentals and Applications* (2nd ed). London: Academic Press.
- Sluiter, a, Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., & Templeton, D. (2008). Determination of Ash in Biomass Laboratory Analytical Procedure (LAP) Issue Date : 7 / 17 / 2005 Determination of Ash in Biomass Laboratory Analytical Procedure (LAP), (January).
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., & Templeton, D. (2008). Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples. *Laboratory Analytical Procedure (LAP) NREL/TP-510-42623*. <https://doi.org/TP-510-42623>
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., & Nrel, D. C. (2008).

- Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass, (April).
- Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., & Templeton, D. (2008). Determination of Extractives in Biomass, (January).
- Soleimani, M., & Tabil, L. (2014). Evaluation of biocomposite-based supports for immobilized-cell xylitol production compared with a free-cell system. *Biochemical Engineering Journal*, 82, 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.11.011>
- Sørensen, H. R., Pedersen, S., Jørgensen, C. T., & Meyer, A. S. (2007). Enzymatic hydrolysis of wheat arabinoxylan by a recombinant “Minimal” enzyme cocktail containing β -xylosidase and Novel endo-1,4- β -xylanase and α -L-arabinofuranosidase activities. *Biotechnology Progress*, 23(1), 100–107. <https://doi.org/10.1021/bp0601701>
- Sørensen, H. R., Pedersen, S., & Meyer, A. S. (2007). Synergistic enzyme mechanisms and effects of sequential enzyme additions on degradation of water insoluble wheat arabinoxylan. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(4), 908–918. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.07.026>
- Sørensen, H. R., Pedersen, S., Viksø-Nielsen, A., & Meyer, A. S. (2005). Efficiencies of designed enzyme combinations in releasing arabinose and xylose from wheat arabinoxylan in an industrial ethanol fermentation residue. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 773–784. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.01.007>
- Steiner, J., Procopio, S., & Becker, T. (2015). Brewer's spent grain: source of value-added polysaccharides for the food industry in reference to the health claims. *European Food Research and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2461-7>
- Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83(1), 1–11. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12058826>
- Teh, S.-S., Bekhit, A. E.-D. A., Carne, A., & Birch, J. (2016). Antioxidant and ACE-inhibitory activities of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysates produced by the proteases AFP, HT, Pro-G, actinidin and zingibain. *Food Chemistry*, 203, 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.057>
- Treimo, J., Aspino, S. I., Eijssink, V. G. H., & Horn, S. J. (2008). Enzymatic Solubilization of Proteins in Brewer's Spent Grain. *J. Agric. Food Chem*, 56(13), 5359–5365. <https://doi.org/10.1021/jf073317s>
- U.S. Department of Energy. (2004). Top value added chemicals from biomass. Volume-I Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. Retrieved from <http://www.nrel.gov/docs/fy04osti/35523.pdf>
- Vázquez, M. J., Garrote, G., Alonso, J. L., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2005). Refining of autohydrolysis liquors for manufacturing xylooligosaccharides: evaluation of operational strategies. *Bioresource Technology*, 96(8), 889–896. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.08.013>

- Venkateswar Rao, L., Goli, J. K., Gentela, J., & Koti, S. (2015). Bioconversion of lignocellulosic biomass to xylitol: An overview. *Bioresource Technology*, 213, 299–310. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.092>
- Vermerris, W. (2008). *Genetic Improvement of Bioenergy Crops*.
- Vieira, E. F., da Silva, D. D., Carmo, H., & Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2017). Protective ability against oxidative stress of brewers' spent grain protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 228, 602–609. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.050>
- Vieira, E., Rocha, M. A. M., Coelho, E., Pinho, O., Saraiva, J. A., Ferreira, I. M. P. L. V. O., & Coimbra, M. A. (2014). Valuation of brewer's spent grain using a fully recyclable integrated process for extraction of proteins and arabinoxylans. *Industrial Crops and Products*, 52, 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.10.012>
- Walther, T., Hensirisak, P., & Agblevor, F. A. (2001). The influence of aeration and hemicellulosic sugars on xylitol production by *Candida tropicalis*. *Bioresource Technology*, 76, 213–220.
- Wang, S., Jiang, L., Li, Y., Li, D., & Sui, X. (2011). Optimization on aqueous enzymatic extraction conditions of pine seed protein by response surface method. *Procedia Engineering*, 15, 4956–4966. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2011.08.922>
- Wang, S., Li, H., Fan, X., Zhang, J., Tang, P., & Yuan, Q. (2015). Metabolic responses in *Candida tropicalis* to complex inhibitors during xylitol bioconversion. *Fungal Genetics and Biology*, 82, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.04.022>
- Wang, W., Ling, H., & Zhao, H. (2015). Steam explosion pretreatment of corn straw on xylose recovery and xylitol production using hydrolysate without detoxification. *Process Biochemistry*, 50(10), 1623–1628. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.06.001>
- Waters, D. M., Jacob, F., Titze, J., Arendt, E. K., & Zannini, E. (2012). Fibre, protein and mineral fortification of wheat bread through milled and fermented brewer's spent grain enrichment. *European Food Research and Technology*, 235, 767–778. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1805-9>
- Wei, J., Yuan, Q., Wang, T., & Wang, L. (2010). Purification and crystallization of xylitol from fermentation broth of corncob hydrolysates. *Frontiers of Chemical Engineering in China*, 4(1), 57–64. <https://doi.org/10.1007/s11705-009-0295-1>
- Wen, X., Sidhu, S., Horemans, S. K. C., Sooksawat, N., Harner, N. K., Bajwa, P. K., ... Lee, H. (2016). Exceptional hexose-fermenting ability of the xylitol-producing yeast *Candida guilliermondii* FTI 20037. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 121(6), 631–637. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.10.011>
- Wilkinson, S., Smart, K. A., & Cook, D. J. (2014). Optimisation of alkaline reagent based chemical pre-treatment of Brewers spent grains for bioethanol production. *Industrial Crops & Products*, 62, 219–227. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.08.036>

- Winkelhausen, E., & Kuzmanova, S. (1998). Microbial conversion of D-xylose to xylitol. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86(1), 1–14. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(98\)80026-3](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(98)80026-3)
- Wood, I. P., Cook, N. M., Wilson, D. R., Ryden, P., Robertson, J. A., & Waldron, K. W. (2016). Ethanol from a biorefinery waste stream: Saccharification of amylase, protease and xylanase treated wheat bran. *Food Chemistry*, 198, 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.108>
- Wouters, A. G. B., Rombouts, I., Fierens, E., Brijs, K., & Delcour, J. A. (2016). Relevance of the Functional Properties of Enzymatic Plant Protein Hydrolysates in Food Systems. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(4), 786–800. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12209>
- Xiros, C., & Christakopoulos, P. (2012). Biotechnological potential of brewers spent grain and its recent applications. *Waste and Biomass Valorization*, 3, 213–232. <https://doi.org/10.1007/s12649-012-9108-8>
- Xiros, C., Katapodis, P., & Christakopoulos, P. (2011). Factors affecting cellulose and hemicellulose hydrolysis of alkali treated brewers spent grain by *Fusarium oxysporum* enzyme extract. *Bioresource Technology*, 102(2), 1688–1696. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.108>
- Xiros, C., Topakas, E., Katapodis, P., & Christakopoulos, P. (2008). Hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain by *Neurospora crassa*. *Bioresource Technology*, 99(13), 5427–5435. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.010>
- Xu, J.-K., & Sun, R.-C. (2016). Recent Advances in Alkaline Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. In *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery* (pp. 431–459).
- Yupsanis, T., Burgess, S. R., Jackson, P. J., & Shewry, P. R. (1990). Characterization of the major protein component from aleurone cells of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Experimental Botany*, 41, 385–392. <https://doi.org/10.2307/23695147>
- Zahedifar, M., Castro, F. B., & Ørskov, E. R. (2002). Effect of hydrolytic lignin on formation of protein-lignin complexes and protein degradation by rumen microbes. *Animal Feed Science and Technology*, 95(1–2), 83–92. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00305-4](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00305-4)
- Zou, Y., Qi, K., Chen, X., Miao, X., & Zhong, J.-J. (2010). Favorable effect of very low initial KLa value on xylitol production from xylose xylose by a self-isolated strain of *Pichia guilliermondii*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109(2), 149–152. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.07.013>